

# UTJECAJ PROTEINA hMSH3 I INTERLEUKINA-6 NA POJAVNOST MIKROSATELITNE NESTABILNOSTI I DVOLANČANIH LOMOVA DNA U SPORADIČNOM KARCINOMU DEBELOG CRIJEVA

---

**Salar, Anamarija**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:236:468329>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Doctoral School, Josip Juraj University in Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

Anamarija Salar

**UTJECAJ PROTEINA hMSH3 I INTERLEUKINA-6 NA  
POJAVNOST MIKROSATELITNE NESTABILNOSTI I  
DVOLANČANIH LOMOVA DNA U SPORADIČNOM  
KARCINOMU DEBELOG CRIJEVA**

Doktorski rad

Osijek, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorski rad

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

**Znanstveno područje:** interdisciplinarno područje znanosti

**Znanstvena polja:** biologija, temeljne medicinske znanosti

### Utjecaj proteina hMSH3 i interleukina-6 na pojavnost mikrosatelitne nestabilnosti i dvolančanih lomova DNA u sporadičnom karcinomu debelog crijeva

Anamarija Salar

**Doktorski rad je izrađen u:** Laboratoriju za personaliziranu medicinu, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

**Mentor/i:** dr. sc. Tamara Čačev, viša znanstvena suradnica IRB

#### Kratki sažetak doktorskog rada:

Mikrosatelitna nestabilnost tipa EMAST i MSI rezultat je neispravnog popravka krivo sparenih baza (MMR). EMAST je povezan s premještanjem hMSH3 iz jezgre u citoplazmu gdje ne može sudjelovati u popravku molekule DNA. Potencijalni uzrok ovog premještanja je signalizacija putem IL-6. U ovom radu ispitali smo ekspresiju proteina hMSH3, IL-6 i  $\gamma$ H2A.X, kao i status polimorfizama gena *MSH3*, *IL-6*, *IL-6R* i *gp130* u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. U našem istraživanju skupine su definirane tako da razlikujemo nestabilnost tipa EMAST koja se javlja samostalno ili udružena s nestabilnosti na dinukleotidnim mikrosatelitnim ponavljanjima (skupina E) odnosno nestabilnost tipa EMAST koja se javlja udruženo s nestabilnost na mononukleotidnim mikrosatelitnim ponavljanjima (skupina M) u odnosu na tumore u kojima nije utvrđena mikrosatelitna nestabilnost (skupina S). U našem istraživanju je u skupinama E i M utvrđen veći udio jezgara negativnih na hMSH3 u odnosu na skupinu S. Nosioči alela C polimorfizma *gp130* +148G/C bili su značajno manje zastupljeni u skupini E u odnosu na skupinu S. U tumorima u kojima nisu dokazane mutacije gena *TP53* utvrđen je veći udio jezgara pozitivnih na  $\gamma$ H2A.X u skupini E u odnosu na skupine S i M. Očekuje se da će rezultati ovog istraživanja doprinijeti razjašnjavanju utjecaja hMSH3 i IL-6 na pojavnost mikrosatelitne nestabilnosti i dvolančanih lomova DNA u sporadičnim karcinomima debelog crijeva.

**Broj stranica:** 95

**Broj slika:** 24

**Broj tablica:** 13

**Broj literaturnih navoda:** 130

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** sporadični karcinom debelog crijeva, mikrosatelitna nestabilnost, MSI, EMAST, hMSH3, IL-6, IL-6R, gp130,  $\gamma$ H2A.X, p53, dvolančani lomovi DNA

**Datum javne obrane:**

**Povjerenstvo za javnu obranu:**

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

**Doktorski rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

PhD thesis

University of Dubrovnik

Ruder Bošković Institute

Doctoral Study of Molecular biosciences

**Scientific Area:** interdisciplinary area of science

**Scientific Fields:** biology, basic medical sciences

### **Influence of hMSH3 and interleukin-6 on the occurrence of microsatellite instability and DNA double-stranded breaks in sporadic colon cancer**

Anamarija Salar

**Thesis performed at:** Laboratory for personalized medicine, Division of molecular medicine, Ruđer Bošković Institute (RBI), Zagreb

**Supervisor/s:** Tamara Čačev, Ph.D, Senior Research Associate RBI

#### **Short abstract:**

Microsatellite instability, (MSI and EMAST) type, rises from an impaired MMR system. EMAST is associated with the translocation of hMSH3 from the nucleus to the cytoplasm, thereby hindering its role in DNA repair. It has been proposed that IL-6 signaling cascade is implicated in this translocation. In this study, we have investigated the expression of hMSH3, IL-6, and  $\gamma$ H2A.X, as well as the status of polymorphisms within the *MSH3*, *IL-6*, *IL-6R*, and *gp130* genes in patients with sporadic colorectal cancer in relation to the presence and type of microsatellite instability. In our study, groups were defined to differentiate EMAST instability occurring independently or in association with instability at dinucleotide microsatellite repeats (group E), and EMAST instability occurring combined with instability at mononucleotide microsatellite repeats (group M) compared to tumors where microsatellite instability was not detected (group S). Compared to the group S, groups E and M exhibited a higher percentage of hMSH3 negative nuclei. Carriers of the *gp130* +148C allele were less frequent in the group E compared to the group S. In the subset of tumors lacking *TP53* mutations, a higher percentage of the  $\gamma$ H2A.X positive nuclei was observed in group E compared to the groups S and M. The results of this study might help clarify the role of hMSH3 and IL-6 in the occurrence of microsatellite instability and DNA double-strand breaks in sporadic colon cancer.

**Number of pages:** 95

**Number of figures:** 24

**Number of tables:** 13

**Number of references:** 130

**Original in:** croatian

**Key words:** sporadic colorectal cancer, microsatellite instability, MSI, EMAST, hMSH3, IL-6, IL-6R, gp130,  $\gamma$ H2A.X, p53, DNA double-strand breaks

**Date of the thesis defense:**

#### **Reviewers:**

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za personaliziranu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Mikrosatelitna nestabilnost (MSI i EMAST) u molekularnom profiliranju sporadičnih karcinoma debelog crijeva“ (HRZZ-IP-2016-06-1430), pod vodstvom dr. sc. Tamare Čačev, više znanstvene suradnice IRB-a.

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Karcinom debelog crijeva.....	2
1.1.1. Molekularna genetika sporadičnog karcinoma debelog crijeva.....	3
1.2. Mikrosatelitna nestabilnost.....	5
1.2.1. Popravak krivo sparenih baza .....	5
1.2.2. Detekcija mikrosatelitne nestabilnosti .....	7
1.2.3. Mikrosatelitna nestabilnost tipa MSI i EMASST u tumorigenezi.....	8
1.2.4. Dualna etiologija nestabilnosti tipa EMASST .....	12
1.3. Funkcionalni polimorfizmi gena <i>MSH3</i> .....	14
1.4. Uloga proteina hMSH3 u popravku dvolančanih lomova .....	16
1.5. Signalni put interleukina-6 i njegova uloga u tumorigenezi.....	18
1.5.1. Funkcionalni polimorfizmi u genima signalnog puta IL-6 .....	21
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	23
3. MATERIJALI I METODE .....	24
3.1. Uzorci .....	24
3.2. Izolacija DNA iz tkiva .....	25
3.3. Određivanje koncentracije DNA .....	26
3.4. Elektroforeza u gelu agaroze .....	26
3.5. Elektroforeza u gelu poliakrilamida .....	27
3.6. Analiza polimorfizama u genu <i>MSH3</i> .....	27
3.6.1. Analiza polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena <i>MSH3</i> .....	27
3.6.2. Analiza polimorfizma <i>MSH3</i> +3133A/G .....	28
3.7. Analiza polimorfizama jednog nukleotida u signalnom putu IL-6.....	29
3.7.1. PCR-RFLP .....	30
3.7.2. <i>Real-time</i> PCR-SNP .....	31
3.8. Analiza mutacija u genu <i>TP53</i> .....	32
3.8.1. PCR-RFLP .....	32
3.8.2. Fluorescentna detekcija heterodupleksa (HRM) .....	33
3.9. Analiza ekspresije proteina imunohistokemijskom metodom.....	35
3.10. Statistika.....	37
4. REZULTATI .....	38
4.1. Analiza funkcionalnih polimorfizama gena <i>MSH3</i> .....	38
4.1.1. Analiza polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena <i>MSH3</i> .....	38

4.1.2.	Analiza polimorfizma <i>MSH3</i> +3133A/G .....	44
4.2.	Analiza ekspresije proteina hMSH3 .....	46
4.3.	Analiza funkcionalnih polimorfizama u signalnom putu interleukina-6.....	49
4.3.1.	Analiza polimorfizma interleukin-6 -174 G/C .....	49
4.3.2.	Analiza polimorfizma receptora interleukina-6 +48892A/C .....	52
4.3.3.	Analiza polimorfizma koreceptora <i>gp130</i> +148G/C.....	55
4.4.	Analiza ekspresije proteina interleukin-6 .....	58
4.5.	Analiza mutacija u genu <i>TP53</i> .....	59
4.5.1.	Analiza mutacija u kodonu 175 gena <i>TP53</i> .....	59
4.5.2.	Analiza mutacija u kodonu 248 gena <i>TP53</i> .....	61
4.5.3.	Analiza mutacija u kodonu 273 gena <i>TP53</i> .....	62
4.6.	Analiza ekspresije proteina $\gamma$ H2A.X .....	63
4.7.	Analiza ekspresije proteina $\gamma$ H2A.X u odnosu na prisutnost mutacija u genu <i>TP53</i> .....	65
5.	RASPRAVA.....	67
6.	ZAKLJUČCI .....	76
7.	LITERATURA.....	78
8.	SAŽETAK .....	93
9.	SUMMARY.....	94
10.	ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA.....	95

# 1. UVOD

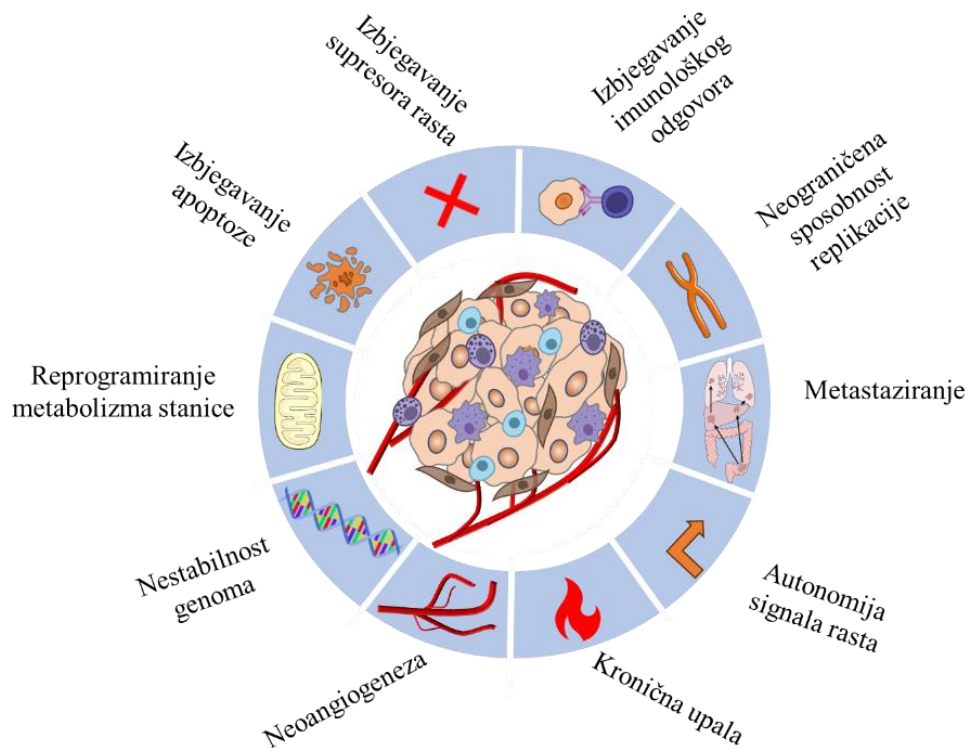
Tumorske bolesti su jedan od vodećih uzroka smrtnosti i značajna prepreka produljenju životnog vijeka populacije u razvijenim zemljama. Unutar ove skupine bolesti, tumori debelog crijeva zauzimaju drugo mjesto po smrtnosti te treće po učestalosti u svijetu [1].

Nastanak tumora je rezultat dugogodišnjeg i stupnjevitog nakupljanja mutacija koje narušavaju strogo regulirane signalne puteve u stanici [2]. Tijekom stupnjevitog procesa zloćudne preobrazbe stanice nakupljaju specifične osobine koje su poznate kao karakteristična obilježja tumora (engl. *hallmarks of cancer*) [3]. Navedene osobine uključuju autonomiju u signalima rasta odnosno poticanje proliferacije stanica i izbjegavanje supresora rasta, neograničenu sposobnost replikacije, izbjegavanje imunološkog odgovora i programirane stanične smrti te reprogramiranje metabolizma stanice. Stvaranje novih krvnih žila (neoangiogeneza) te stjecanje osobina vezanih uz invazivnost i metastaziranje su osobine koje su bitne za daljnje napredovanje tumora. S vremenom su definirana i dva olakšavajuća čimbenika tumorigeneze, nestabilnost genoma i kronična upala (Slika 1) [4].

Kronična upala olakšava stjecanje karakterističnih obilježja tumora na način da stanice imunološkog sustava u mikrookoliš tumora luče čimbenike rasta i preživljenja te enzime koji mijenjaju izvanstanični matriks. Preko navedenih molekula stanice imunološkog sustava potiču tumorske stanice na održavanje proliferativne signalizacije, izbjegavanje programirane stanične smrti, angiogenezu, invaziju i metastaziranje [4,5].

Nestabilnost genoma je u značajnoj mjeri odgovorna za visoke stope mutacija odnosno hipermutabilni genotip uočen u mnogim tumorima. Pretpostavlja se da nestabilnost genoma stvara genetsku raznolikost tumorskih stanica te ubrzava stjecanje karakterističnih obilježja tumora [4].





**Slika 1.** Karakteristična obilježja tumora koje stanica mora steći tijekom procesa tumorigeneze (preuzeto i prilagođeno prema [4]).

## 1.1. Karcinom debelog crijeva

Karcinom debelog crijeva jedan je od prvih i najbolje molekularno okarakteriziranih solidnih tumora te je poslužio kao model za opisivanje stupnjevite tumorigeneze, no unatoč desetljećima istraživanja, molekularna etiopatologija ovog tumora nije u potpunosti razjašnjena [6]. Čimbenici koji doprinose zloćudnoj preobrazbi epitelnih stanica crijeva u tumorske su vrlo heterogeni te uključuju nasljedne i okolišne komponente. Obzirom na način nastanka razlikujemo sporadične (70-75 % oboljelih) i nasljedne (5-10 % oboljelih) tumore debelog crijeva te one u kojima je detektirana potencijalna predispozicija za razvoj ove bolesti u širem nasljednom kontekstu (20-25 % oboljelih) [7]. Nastanku i napredovanju sporadičnog karcinoma debelog crijeva uvelike doprinosi mikrobiom pojedinca te životni stil koji uključuje pušenje, konzumaciju alkohola, pretilost i nedovoljnu tjelesnu aktivnost [8]. Ovi čimbenici ne samo da imaju izravan utjecaj na

genom, već također potiču stanje dugotrajne kronične upale koje, s vremenom, doprinosi nastanku i napredovanju tumora [9].

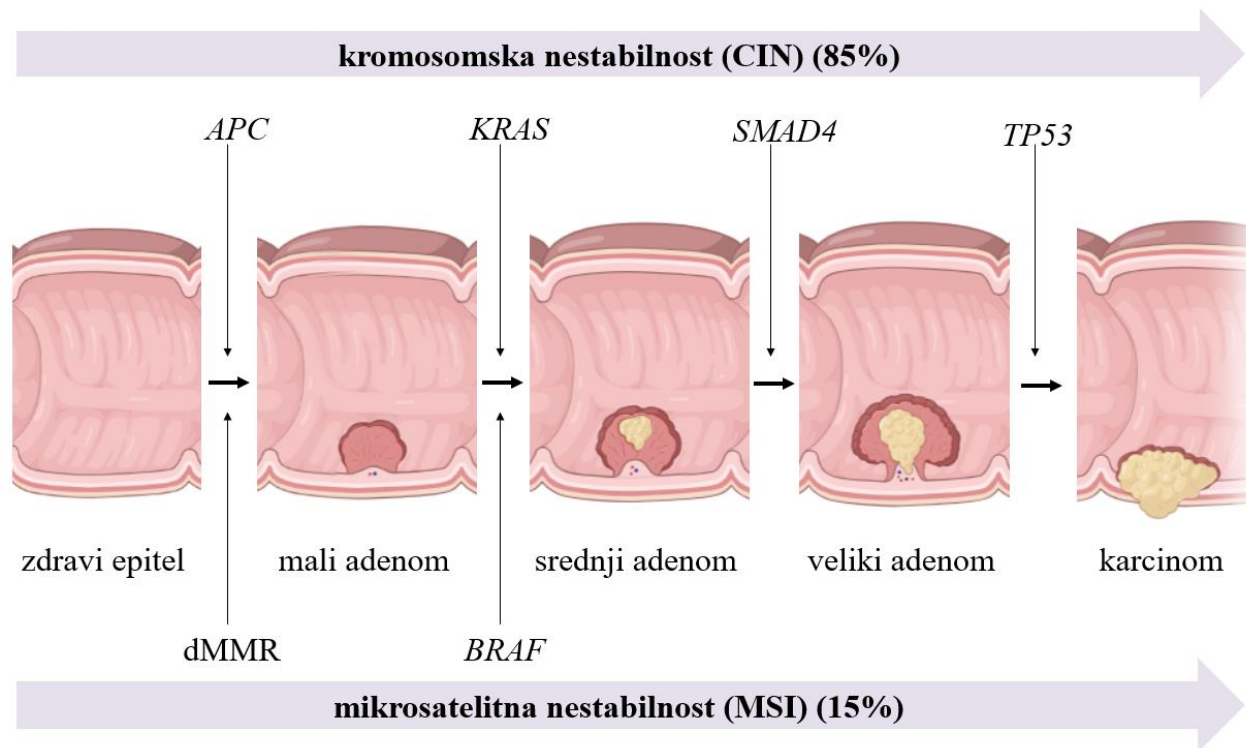
Kod nasljednih oblika karcinoma debelog crijeva, mutacije tumor supresor gena ili gena povezanih s popravkom krivo sparenih baza DNA (MMR, od engl. *mismatch repair*) prenose se spolnim stanicama. Dva najpoznatija nasljedna oblika karcinoma debelog crijeva su: obiteljska adenomatozna polipoza (FAP, od engl. *familial adenomatous polyposis*) i nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC, od engl. *hereditary non polyposis colorectal cancer* ili sindrom Lynch), od kojih je HNPCC znatno učestaliji [7]. Karakteristična promjena prisutna u tumorima osoba s nasljednim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom jest mikrosatelitna nestabilnost, no ona se može javiti i u sporadičnim tumorima debelog crijeva uslijed stečene promjene u nekom od gena za popravak DNA putem sustava MMR. Stoga su kronična upala i nestabilnost genoma često usko povezani s razvojem i progresijom ovih tumora [10].

### **1.1.1. Molekularna genetika sporadičnog karcinoma debelog crijeva**

Kako je prije navedeno, u većini slučajeva tumori debelog crijeva nastaju sporadično te se razvijaju postupno tijekom godina [11]. Nastanak i napredovanje ovih tumora prati molekularno-genetički slijed promjena koje se manifestiraju i na morfološkoj razini, a poznate su kao sekvenca adenom-karcinom [12]. Ključne mutacije u spomenutoj sekvenci adenom-karcinom tumora debelog crijeva su mutacije tumor supresorskih gena *APC*, *TP53* i *SMAD4* te mutacije onkogena *KRAS* [6,7].

Mutacija tumor supresorskog gena *APC* predstavlja rani događaj u nastanku karcinoma debelog crijeva. Kada je gen *APC* mutiran, dolazi do povećane aktivacije signalnog puta Wnt/ $\beta$ -catenin što rezultira nekontroliranom staničnom proliferacijom i formiranjem adenoma [13]. Sljedeći rani događaj u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva je mutacija gena *KRAS*. Rezultat navedene mutacije je kontinuirano aktivan protein *KRAS* koji potiče nizvodne signalne puteve vezane uz proliferaciju i preživljenje stanice te ima značajnu ulogu u prijelazu malih u velike adenome [14,15]. Kasni događaj u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva je mutacija tumor supresorskog gena *TP53* [14]. Ova mutacija je povezana s gubitkom funkcije proteina p53 čime

se izravno potiče kromosomska nestabilnost (CIN od engl. *chromosomal instability*) te se također stvara prikladno okruženje za druge mehanizme vezane uz nestabilnost genoma (Slika 2) [16].



**Slika 2.** Fearon-Vogelsteinov model (sekvenca adenom-karcinom) nastanka i napredovanja tumora debelog crijeva. Ilustrirano pomoću programa BioRender.com.

Kromosomska nestabilnost prisutna je u 85 % slučajeva sporadičnih karcinoma debelog crijeva te se povezuje s klasičnom sekvencom adenom-karcinom. Karakteristika ove vrste nestabilnosti je izmijenjeni kariotip odnosno strukturne promjene kromosoma koje doprinose raznolikosti pokretačkih (engl. *driver*) mutacija u tumorigenezi. Druga vrsta nestabilnosti genoma koja doprinosi nastanku tumora debelog crijeva je mikrosatelitna nestabilnost prisutna u 15 % slučajeva sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Mikrosatelitna nestabilnost se povezuje s gubitkom funkcije proteina uključenih u sustav popravaka krivo sparenih baza (MMR) [17,18].

## 1.2. Mikrosatelitna nestabilnost

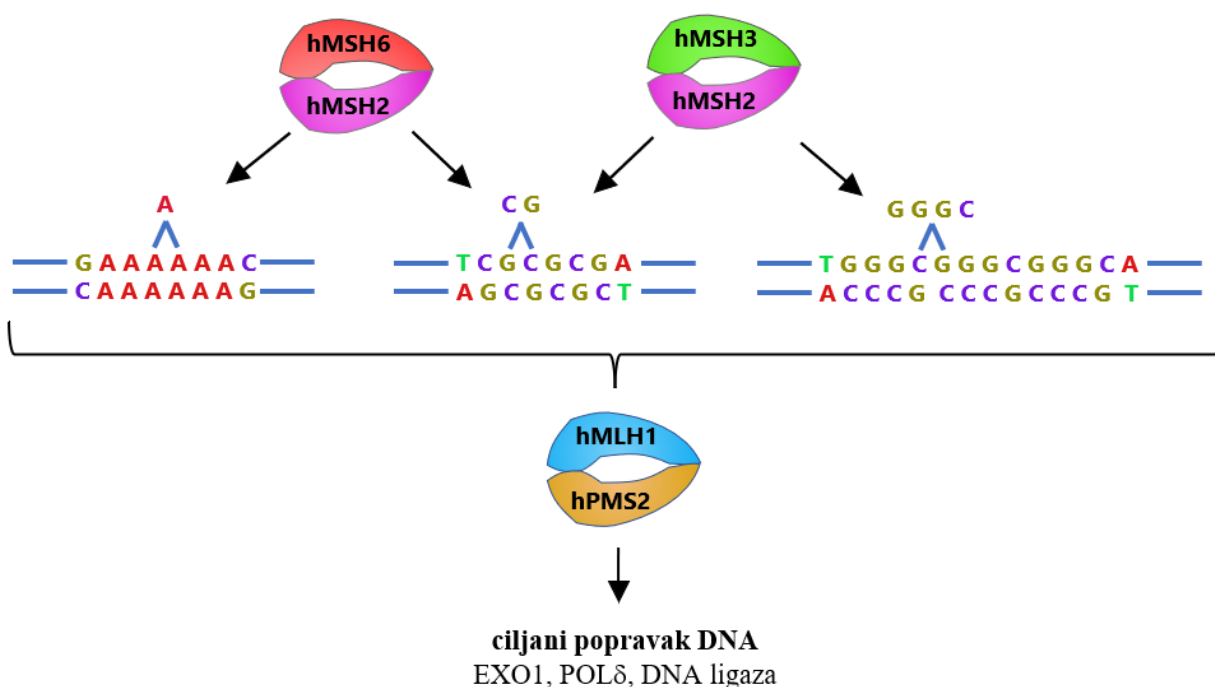
Mikrosateliti su kratki (1-6 pb) sljedovi nukleotida u molekuli DNA koji se uzastopno ponavljaju do 50 puta. Mikrosatelitne sekvence sačinjavaju 3 % ljudskog genoma te se nalaze i u kodirajućim i nekodirajućim dijelovima sekvence [19]. Upravo zbog svoje ponavljajuće prirode mikrosateliti predstavljaju „vruća“ mjesta (od engl. *hotspots*) u molekuli DNA na kojima češće dolazi do proklizavanja DNA polimeraze. Mutacije koje nastaju uslijed proklizavanja DNA polimeraze su mutacije pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift*). Kada su navedene mutacije prisutne na mono-, di-, tetra- i više nukleotidnim mikrosatelitnim ponavljanjima tada govorimo o mikrosatelitnoj nestabilnosti [20].

Do proklizavanja DNA polimeraze dolazi tijekom replikacije kada DNA polimeraza zastane na ponavljajućim sljedovima te se djelomično odvoji s lanca DNA. Sparivanjem lanca kalupa i novosintetiziranog lanca ostaju nesporene nukleotidne petlje bilo u lancu kalupu ili novosintetiziranom lancu. Ako se petlja nalazi na novosintetiziranom lancu tijekom idućeg ciklusa replikacije DNA dolazi do insercije jedne ili više ponavljajućih sekvenci, međutim ako je petlja nastala na lancu kalupu u idućoj replikaciji dolazi do delecije zahvaćenog segmenta DNA [10].

### 1.2.1. Popravak krivo sparenih baza

Postreplikacijski popravak molekule DNA koji prepoznaje i popravlja greške proklizavanja DNA polimeraze je sustav popravaka krivo sparenih baza (MMR) [10,21]. Ovaj popravak je iznimno očuvani biološki put čija je glavna uloga popravljanje pojedinih pogrešno sparenih baza, te popravljanje insercija odnosno delecija koje dovode do pomaka okvira čitanja [22,23]. Popravak krivo sparenih baza započinje kada se heterodimer MutS homologa, bilo MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ ) ili MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ ), veže na molekulu DNA na mjestu gdje je došlo do pogrešnog sparivanja nukleotida. Heterodimer MutS $\alpha$  prepoznaje pojedinačne krivo sporene baze te mutacije pomaka okvira čitanja na mono- i dinukleotidnim ponavljanjima. MutS $\beta$  prepoznaje mutacije pomaka okvira čitanja na dinukleotidnim ili dužim ponavljanjima [24].

Postoji preklapanje između funkcija heterodimera MutS $\alpha$  i MutS $\beta$  u prepoznavanju dinukleotidnih mikrosatelitnih ponavljanja. Međutim, biokemijska istraživanja su pokazala da u usporedbi s MutS $\alpha$ , MutS $\beta$  preferencijalno prepoznaje dinukleotidna ponavljanja. Stoga gubitak funkcije proteina hMSH3 ostavlja nepopravljene petlje s dva ili više nukleotida pri čemu MutS $\alpha$  popravljaju neke, ali ne sve takve petlje [10,21]. Nakon što jedan od heterodimera MutS $\alpha$  ili MutS $\beta$  prepozna grešku, dolazi do vezanja heterodimera MutL $\alpha$  koji se sastoji od hMLH1 i hPMS2. Klizni držač DNA (PCNA, od engl. *proliferating cell nuclear antigen*) stupa u interakciju s kompleksom MutL $\alpha$  te je time omogućena endonukleazna aktivnost hPMS2 proteina. Potom egzonukleaza 1 (EXO1) uklanja zahvaćene baze iz novosintetiziranog lanca DNA. Slijedi resinteza DNA uz pomoć DNA polimeraze  $\delta$  (POL $\delta$ ) i spajanje ureza pomoću DNA ligaze ili, ukoliko je oštećenje DNA preveliko, stanica odlazi u apoptozu (Slika 3). Time se sprečava prijenos greške na stanice kćeri te se osigurava integritet genoma [24]. Ukoliko u tumorima dođe do gubitka funkcije nekog od proteina uključenih u popravak putem sustava MMR dolazi do pojave mikrosatelitne nestabilnosti [10].



**Slika 3.** Popravak krivo sparenih baza.

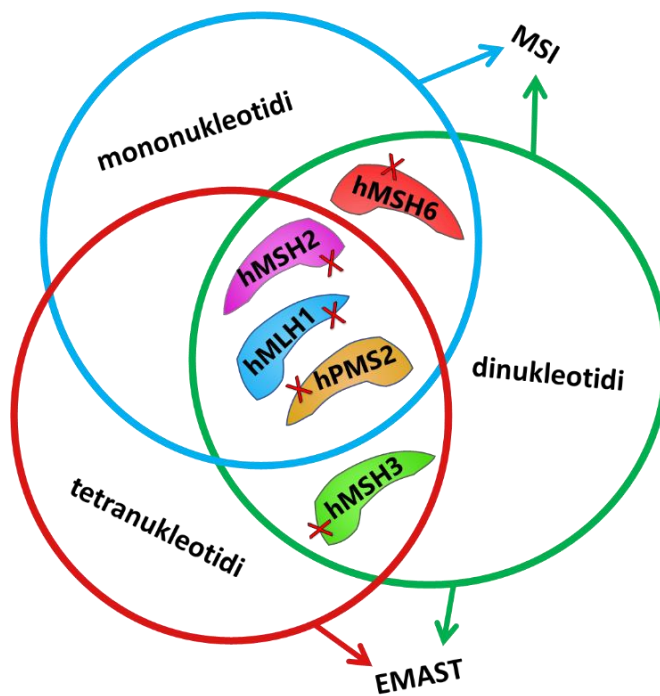
## 1.2.2. Detekcija mikrosatelitne nestabilnosti

U detekciji mikrosatelitne nestabilnosti koristi se nekoliko pristupa među kojima su najčešći analiza ekspresije proteina sustava MMR (hMLH1, hPMS2, hMSH2 i hMSH6) imunohistokemijskom metodom, te detekcija mikrosatelitne nestabilnosti na razini genomske DNA korištenjem specifičnih polimorfnih mikrosatelitnih biljega metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) [25].

Na konvenciji National Cancer Institute u Bethesda 1998. godine postignut je konsenzus u detekciji mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI. Predložen je panel koji se sastoji od dva mononukleotidna (BAT25 i BAT26) i tri dinukleotidna polimorfna mikrosatelitna biljega (D2S123, D5S346 i D17S250) [26]. Tumori u kojima nije uočena nestabilnost na ovih pet biljega smatraju se stabilnima obzirom na mikrosatelitnu nestabilnost (MSS, od engl. *microsatellite stable*). Međutim, ako je nestabilnost prisutna na dva ili više MSI biljega tada govorimo o visoko nestabilnim (MSI-H od engl. *microsatellite high*) tumorima, a u slučaju kada samo jedan od pet biljega pokazuje nestabilnost tada govorimo o nisko nestabilnim (MSI-L od engl. *microsatellite low*) tumorima. Iako je pojava nestabilnosti na tetranukleotidnim biljezima EMAST (od engl. *elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats*) uočena istovremeno s nestabilnošću na mono i dinukleotidima, nije joj pridavan poseban značaj te su tetranukleotidni biljezi izostavljeni u definiranju konsenzusa postignutog u Bethesda. Stoga za detekciju nestabilnosti na tetranukleotidnim ponavljanjima ne postoji konsenzusni panel kao u slučaju detekcije nestabilnosti tipa MSI. no u literaturi se najčešće koristi panel od pet tetranukleotidnih biljega (MYCL1, D9S242, D20S85, D8S321 i D20S82) [27].

Ovisno o tome koji od proteina iz sustava MMR nije funkcionalan, „profil“ promjena koje se uočavaju analizom Bethesda panela može se razlikovati. Primjerice u slučaju nefunkcionalnog proteina hMSH2, hMLH1 ili hPMS2 popravak krivo sparenih baza je u potpunosti odsutan te su mogući pomaci na mono-, di- i tetra- nukleotidnim mikrosatelitnim biljezima, dok je u slučaju nefunkcionalnih proteina hMSH6 ili hMSH3 prisutna specifična vrsta nestabilnosti vezana uz njihovu različitu ulogu u popravku krivo sparenih baza. Nefunkcionalni MSH6 protein povezan je s mutacijama pomaka okvira čitanja na mono- i dinukleotidnim sekvencama. Međutim u

slučaju nefunkcionalnog hMSH3 proteina pomaci su prisutni na dinukleotidnim ili dužim ponavljanjima, dok pomaci na mononukleotidnim sekvencama izostaju (Slika 4) [28–33].



**Slika 4.** Gubitak funkcije proteina (oznaka X) sustava MMR i profil promjena detektiranih na razini mikrosatelitnih biljega.

### 1.2.3. Mikrosatelitna nestabilnost tipa MSI i EMAST u tumorigenezi

Mikrosatelitna nestabilnost je kao tip genomske nestabilnosti opisana prilično rano u povijesti molekularne onkologije [34–36] te je definirana kao prisutnost brojnih insercijskih i delecijских pomaka u mikrosatelitnim sekvencama tumora u usporedbi sa statusom istih lokusa u pripadajućem zdravom tkivu iste osobe [26]. U kontekstu karcinoma debelog crijeva ovaj je tip nestabilnosti po prvi put opisan 1993. godine [37]. Tada je otkrivena i molekularna osnova mikrosatelitne nestabilnosti povezana s nasljednim mutacijama gena *MSH2*, a kasnije i s nasljednim mutacijama drugih gena sustava MMR (*MLH1*, *PMS2* i *MSH6*) [38].

Gubitak funkcije sustava za popravak krivo sparenih baza omogućuje tumoru akumuliranje velikog broja mutacija u relativno kratkom vremenu. Razvoj tumora putem mikrosatelitne nestabilnosti može se dogoditi u nekoliko godina, dok razvoj tumora putem kromosomske nestabilnosti (CIN, od engl. *chromosomal instability*) može potrajati 10 i više godina [39]. Tumore debelog crijeva u kojima je prisutna visoka razina nestabilnosti tipa MSI (MSI-H) karakterizira opsežna genetička heterogenost kako između tako i unutar tumora [40]. Zbog veće genomske nestabilnosti ovih tumora, oni ubrzano nakupljaju mutacije u nizu onkogeni i tumor supresorskih gena te imaju i povećanu stopu mutacija (TMB, od engl. *tumor mutational burden*) te veći broj neoantigena u odnosu na stabilne (MSS) tumore [41,42]. Prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti može se javiti vezano uz nasljedne mutacije gena u popravku krivo sparenih baza te nije ograničena samo na karcinome debelog crijeva već je opisana i u drugim zloćudnim oboljenjima uključujući karcinome endometrija, želuca, prostate i jajnika u kontekstu nasljednog sindroma Lynch [43,44].

Kada je riječ o sporadičnim slučajevima karcinoma debelog crijeva, mikrosatelitna nestabilnost je opisana u 15 % slučajeva te je uglavnom posljedica hipermetilacije promotora gena *MLH1* [45]. Uz hipermetilaciju promotora gena *MLH1*, sporadične karcinome debelog crijeva također karakterizira prisutnost mutacije gena *BRAF* [46]. Također, tumori s visokom razinom mikrosatelitne nestabilnosti pokazuju specifične kliničke karakteristike u odnosu na tumore u kojima nije prisutna nestabilnost. Većinom se nalaze na desnoj strani debelog crijeva, slabo su diferencirani te su bogato infiltrirani limfocitima [18]. Prognostički gledano, upravo oboljeli s visoko nestabilnim tumorima (MSI-H) debelog crijeva pokazuju bolje preživljenje i odgovor na imunoterapiju u odnosu na stabilne (MSS) i nisko nestabilne tumore (MSI-L) [44,47]. Bolja prognoza povezana s mikrosatelitnom nestabilnošću proizlazi iz činjenice da je ova nestabilnost prisutna i u kodirajućim dijelovima genoma te da uslijed pomaka u okviru čitanja nastaju novi, kraći proteini, tzv. neopeptidi. Kada imunološki sustav prepozna neopeptide, dolazi do akumulacije limfocita u tumorskom mikrookolišu. Konačni rezultat specifičnog odgovora limfocita na neoantigene je aktivacija procesa za suzbijanje rasta i širenja tumora. Upravo zato MSI-H status predstavlja koristan prognostički pokazatelj te je povezan s boljom prognozom i preživljenjem oboljelih [33]. Veća imunogenost usljed pristunosti neopeptida čini ove tumore također pogodnim kandidatima za imunoterapiju [48].



Mikrosatelitna nestabilnost na tetranukleotidnim ponavljanjima (EMAST) predstavlja specifični tip mikrosatelitne nestabilnosti koja se javlja samostalno ili u kontekstu nestabilnosti tipa MSI udružena s nestabilnošću na mono- i dinukleotidnim ponavljanjima [49]. Iako je ovaj tip nestabilnosti opažen gotovo istovremeno kao i nestabilnost tipa MSI, istraživanja vezana uz nestabilnost tipa EMAST su zaostajala [26,50]. Haugen i sur. (2008) prvi su povezali nestabilnost tipa EMAST s gubitkom ekspresije proteina hMSH3 u karcinomima debelog crijeva [28]. Ipak, konkretni mehanizam gubitka funkcije proteina hMSH3 nije do kraja razjašnjen. Nasljedne mutacije gena *MSH3* su vrlo rijetke, a također nema dokaza o epigenetskom utišavanju gena *MSH3* [50]. Međutim, mutacije gena *MSH3* opisane su kao sekundarni događaj u kontekstu MSI-H sporadičnih tumora debelog crijeva kod kojih je primarni događaj hipermetilacija promotora gena *MLH1* ili u kontekstu nasljednih tumora gdje je primarno prisutna mutacija u genima *MLH1*, *MSH2* ili *PMS2*. Do ovih mutacija dolazi u eksonu 7 gena *MSH3* u mononukleotidnoj ponavljajućoj mikrosatelitnoj sekvenci (A)<sub>8</sub> što izaziva pomak u okviru čitanja te rezultira kraćim nefunkcionalnim proteinskim produktom [50]. Haugen i sur. (2008) su na staničnoj linijama karcinoma kolona HCT116 dokazali da stanice deficitarne u hMSH3 uz nestabilnost tipa EMAST pokazuju i nisku razinu mikrosatelitne nestabilnosti na dinukleotidnim ponavljanjima, te odsutnost nestabilnosti na mononukleotidnim ponavljanjima [28]. Kasnija istraživanja *in vitro* na ovom staničnom modelu također su povezala nestabilnost tipa EMAST s gubitkom funkcije proteina hMSH3 [30,32].

U novije vrijeme ipak su identificirane rijetke nasljedne mutacije gena *MSH3* primjenom metode sekvenciranja cijelog genoma. Analizom tkiva osoba koje su nositelji ovih mutacija utvrđena je prisutnost nestabilnosti tipa EMAST koja se u genomu ovih pojedinaca manifestira mutacijama na di- i tetranukleotidima [29,31,51]. Ova opažanja su u skladu s prethodno opisanom molekularnom funkcijom heterodimera MutS $\beta$ , koji preferencijalno prepoznaje mutacije pomaka okvira čitanja od 2-13 nukleotida [52]. Molekularna funkcija proteina hMSH3 djelomično se preklapa s funkcijom proteina hMSH6. Stoga gubitak bilo kojeg od ova dva proteina izaziva „slabiji mutatorski“ fenotip u usporedbi s gubitkom proteina hMLH1 ili hMSH2 kada dolazi do potpunog dokidanja funkcije sustava MMR. Gubitak funkcije proteina hMSH6 utječe na funkciju kompleksa MutS $\alpha$  te uzrokuje mikrosatelitnu nestabilnost na mononukleotidnim te u manjoj mjeri na dinukleotidnim ponavljanjima. Gubitak funkcije proteina hMSH3 pak utječe na funkciju kompleksa MutS $\beta$ , uzrokujući mikrosatelitnu

nestabilnost na di-, tri- i tetranukleotidnim biljezima, uz izostanak nestabilnosti na mononukleotidnim biljezima (Slika 4) [28–30,32]. Djelomična redundancija između funkcija MutS $\alpha$  i MutS $\beta$ , zajedno s povećanjem ekspresije i stabilnosti proteina hMSH3 u odsutnosti hMSH6, ukazuje da se većina grešaka na dinukleotidnim ponavljanjima popravljaju pomoću proteina hMSH3 [53].

Nestabilnost tipa EMAS $T$  opisana je, uz karcinome debelog crijeva, u nizu drugih tumora, uključujući karcinome želuca, pluća, jajnika i mokraćnog mjehura [54]. Učestalost nestabilnosti tipa EMAS $T$  u ovim zloćudnim oboljenjima varira od 9 % do 75 % [54]. Ova velika varijabilnost može biti posljedica razlika u biologiji samih tumora, ali može biti i posljedica različitih definicija nestabilnosti tipa EMAS $T$  i nedostatka konsenzusa u njegovom definiranju. Naime, u literaturi je prisutno korištenje različitih mikrosatelitnih biljega, te različitih pragova detekcije. [54,55]. Primjerice Haugen i sur. (2008) su u svom istraživanju dokazali da je nestabilnost tipa EMAS $T$  prisutna u 60 % sporadičnih karcinoma debelog crijeva [28]. Međutim, Ranjbar i sur. proveli su meta-analizu koja je obuhvatila 4922 oboljelih iz 16 neovisnih studija te su utvrdili da je nestabilnost tipa EMAS $T$  bila prisutna u 33 % karcinoma debelog crijeva. Također, u studijama koje su obuhvaćene ovom meta-analizom učestalost nestabilnosti tipa EMAS $T$  se uvelike razlikovala, pri čemu je opaženi raspon bio između 11 % i 64 %. Najniža učestalost ovog tipa nestabilnosti utvrđena je u populaciji Tajvana, dok je najviša utvrđena u japanskoj populaciji [56].

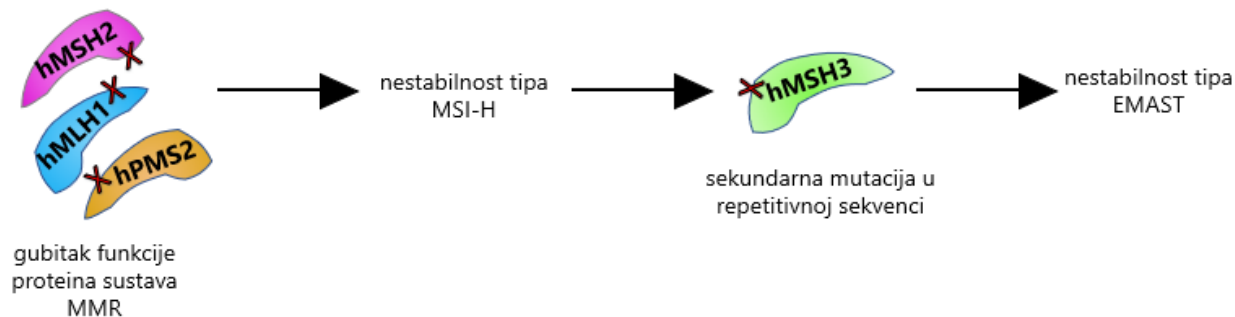
Obzirom na karakteristike tumora te prognozu oboljelih također je utvrđena i razlika između tumora u kojima je bila prisutna nestabilnost tipa EMAS $T$  u odnosu na tumore u kojima je utvrđena prisutnost nestabilnost tipa MSI. Tumori u kojima je prisutna nestabilnost tipa EMAS $T$  povezani su s lošijom prognozom oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na oboljele u čijim tumorima je prisutna nestabilnost tipa MSI-H [57]. Dodatno, tumori u kojima je prisutna nestabilnost tipa EMAS $T$  nakupljaju manje somatskih mutacija u usporedbi s tumorima u kojima je prisutna nestabilnost tipa MSI-H te istovremeno izostaju mutacije na mononukleotidnim ponavljanjima koje su ključne za stvaranje neoantigena [10]. Stoga se smatra da su tumori u kojima je utvrđena nestabilnost tipa EMAS $T$  manje imunogeni u odnosu na tumore s nestabilnošću tipa MSI-H, za koje je poznato da bolje odgovaraju na imunoterapiju [58].

## 1.2.4. Dualna etiologija nestabilnosti tipa EMAST

Budući da je nestabilnost tipa EMAST prisutna u značajnom broju tumora debelog crijeva za pretpostaviti je da potencijalno može tumoru davati određenu selektivnu prednost te imati ulogu u moderiranju njegovog nastanka i napredovanja. Stoga je razumijevanje ovog fenomena te razjašnjenje njegove uloge u tumorigenezi bitno za rasvjetljavanje molekularne etiopatologije karcinoma debelog crijeva.

Nestabilnost tipa EMAST prvotno je opisana u kontekstu gubitka funkcije ključnih proteina sustava MMR (hMLH1, hMSH2 i hPMS2), no u novije vrijeme u literaturi je opisan i izolirani, stečeni gubitak funkcije proteina hMSH3 izvan konteksta viskonestabilnih MSI-H tumora. Stoga se danas smatra kako nestabilnost tipa EMAST može nastati na dva ključna načina ovisno o molekularnom mehanizmu gubitka funkcije proteina hMSH3 [55].

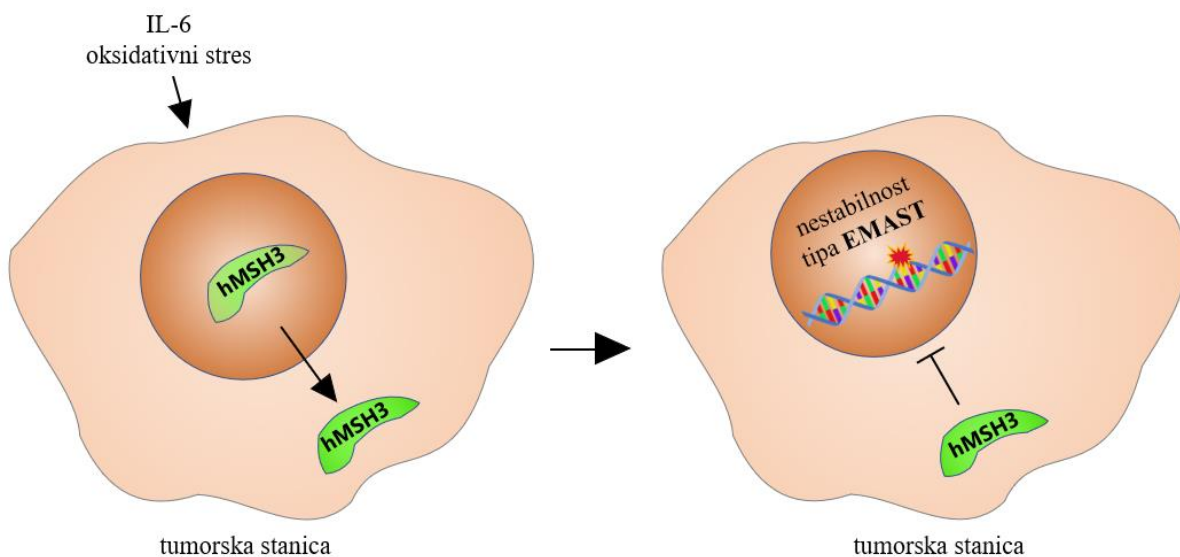
Gubitak funkcije ključnih proteina hMLH1, hPMS2, i hMSH2 predstavlja značajno oštećenje sustava za popravak krivo sparenih baza (MMR) koje se na razini genoma može manifestira kao nestabilnost tipa MSI. Gubitak funkcije bilo kojeg od proteina koji se nalazi „nizvodno“ od proteina hMSH3 rezultira pomacima na mono-, di-, tri- i tetranukleotidnim ponavljanjima [33]. Također, hipermetilacija promotora gena *MLH1*, te nasljedne mutacije gena *MLH1*, *MSH2* ili *PMS2* mogu rezultirati sekundarnom mutacijom gena *MSH3* [50]. U opisanim slučajevima nestabilnost tipa EMAST većinom se javlja udruženo s pomacima na mono- i dinukleotidnim mikrosatelitnim biljezima (Slika 5) [33].



**Slika 5.** Nastanak nestabilnost tipa EMAST u kontekstu viskonestabilnih (MSI-H) tumora.

Izolirani gubitak funkcije proteina hMSH3 je stečena promjena koja je najviše istraživana u kontekstu karcinoma debelog crijeva. Haugen i sur. (2008) su analizom patohistoloških preparata sporadičnih tumora debelog crijeva povezali prisutnost nestabilnost tipa EMAS (MSI-L/EMAS i MSS/EMAS) s heterogenim obrascem gubitka ekspresije proteina hMSH3 u jezgrama tumorskih stanica [28].

Predloženi mehanizam izoliranog gubitka funkcije proteina hMSH3 povezan je s njegovom sposobnošću kruženja između jezgre i citoplazme. Smatra se kako je citoplazmatski smještaj proteina hMSH3 presudan za gubitak funkcije ovog proteina u stanici, budući da se na taj način sprječava njegovo sudjelovanje u popravku putem sustava MMR u jezgri [32]. Kao mogući uzrok premještanja proteina hMSH3 iz jezgre u citoplazmu predložena je signalizacija putem interleukina-6 (IL-6) kao odgovor na upalu i/ili oksidativni stres. U istraživanju provedenom na staničnim linijama tumora debelog crijeva, pokazano je da prisutnost IL-6 i aktivacija nizvodnog signalnog puta JAK/STAT3, kao i oksidativni stres, potiču premještanje proteina hMSH3 iz jezgre u citoplazmu. Uz to je u tumorima debelog crijeva u kojima je bila prisutna nestabilnost tipa EMAS uočena i pojačana ekspresija proteina IL-6 [59]. Gubitak funkcije proteina hMSH3, njegovim premještanjem iz jezgre u citoplazmu pod utjecajem upale ili oksidativnog stresa predstavlja jedinstveni mehanizam gubitka funkcije koji nije opisan za druge komponente sustava MMR (Slika 6) [21].



**Slika 6.** Nastanak nestabilnosti tipa EMAS u kontekstu Izoliranog gubitka funkcije proteina hMSH3 pod utjecajem upale i/ili oksidativnog stresa.

### 1.3. Funkcionalni polimorfizmi gena *MSH3*

Gen *MSH3* nalazi se na kromosomu 5 (5q14) te kodira za protein hMSH3 [60]. U genu *MSH3* opisan je niz polimorfizama, no tek je za nekolicinu opisana povezanost s funkcijom proteina hMSH3.

U prvom eksonu gena *MSH3* nalazi se polimorfna repetitivna sekvenca koja se sastoji od 9 parova baza (G[C]CCG[C]CAGCC). Najčešći aleli koji se javljaju u populaciji su alel FL (6 ponavljanja) te drugi najčešći alel  $\Delta$  (3 ponavljanja) (Slika 7) [61].

<b>FL → 6 • 9pb</b>
...GCT GCA GCG GCT <b>T GCA GCG GCC GCA GCG GCC GCA GCG CCC</b> CCA GCG CCC <b>CCA GCT CCC</b> GCC TTC CCG...
<b><math>\Delta</math>27bp → <math>\Delta</math>3 • 9pb</b>
...GCT GCA GCG GCC <b>GCA GCG CCC</b> CCA GCG CCC GCC TTC CCG...
<b>ins9</b>
...GCT GCA GCG GCT <b>T GCA GCG GCC GCA GCG GCC GCA GCG CCC GCA GCG CCC</b> CCA GCG CCC <b>CCA GCT CCC</b> GCC TTC CCG...

**Slika 7.** Prikaz sekvence najčešćih alela repetitivne sekvence u prvom eksonu gena *MSH3*.

Također postoje aleli koji uključuju inserciju jednog ili dva ponavljanja cjelokupne repetitivne sekvence u odnosu na najčešći alel FL, ins9 (ukupno 7 ponavljanja) i ins18 (ukupno 8 ponavljanja) te deleciju jednog ponavljanja del9 (ukupno 5 ponavljanja). U literaturi su također opisani i aleli koji sadrže inserciju 4 nukleotida (ins4) [62,63].

Translacijom ove repetitivne sekvence u proteinu nastaje regija bogata prolinom i alaninom koja se naziva poli-Ala trakt (od engl. *poly-Ala tract*). Ova regija se nalazi u blizini mjesta koje kodira za lokalizacijski signal koji usmjerava protein hMSH3 u jezgru (NLS, prema engl. *Nuclear Localization Signal*) te se stoga pretpostavlja da utječe na funkciju proteina hMSH3 [61,64]. Tseng-Rogenski i sur. (2020) su pokazali da alel  $\Delta$  koji ima tri seta ponavljanja manje u odnosu na alel FL, utječe na promjenu konformacije proteina hMSH3. Ova promjena skraćuje ponavljajući slijed alanina i prolina u polipeptidnom lancu što u konačnici dovodi do premještanja sekvence NLS1 na manje dostupnu lokaciju čime je otežan povratak proteina hMSH3 u jezgru. Također je u uvjetima *in vitro* pokazano da u stanicama staničnih linija karcinoma debelog crijeva koje su nosioci bilo alela FL (HT29) ili alela  $\Delta$  (SW480) uslijed tretmana interleukinom-6 dolazi do premještanja proteina hMSH3 iz jezgre u citoplazmu.

Međutim, uslijed tretmana vodikovim peroksidom (čime se simuliraju uvjeti oksidativnog stresa) samo je u slučaju nosioca alela  $\Delta$  opaženo premještanje proteina hMSH3 u citoplazmu. Dakle, postoji veća mogućnost u nosioca alela  $\Delta$  za nakupljanje proteina hMSH3 u citoplazmi u odnosu na nosioce alela FL [61].

Osim uloge u tumorigenezi, opisana je i uloga hMSH3 u neurološkim oboljenjima, Huntingtonovoj bolesti i miotoničnoj distrofiji tipa 1 [63]. Naime kada nema replikacije molekule DNA protein hMSH3 katalizira ekspanziju i kontrakciju trinukleotidnih ponavljanja CAG-CTG. Smatra se da ekspanzije trinukleotidnih ponavljanja u somatskim tkivima doprinose napredovanju bolesti [65]. Stoga je u oboljelih od Huntingtonove bolesti odnosno miotonične distrofije tipa 1 ispitano utječe li polimorfnost repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* na ekspresiju ovog gena. Dobiveni rezultati pokazuju da je alel  $\Delta$  povezan sa smanjenom ekspresijom *MSH3*, dok su aleli ins9 i ins18 povezani s povećanom ekspresijom *MSH3*. Također, alel  $\Delta$ , koji je odgovoran za smanjenu ekspanziju trinukleotidnih ponavljanja, također je povezan s blažom kliničkom slikom Huntingtonove bolesti [63]. Iz svega navedenog može se zaključiti kako repetitivna sekvenca u eksonu 1 gena *MSH3* ima ulogu u različitim aspektima funkcije ovog proteina.

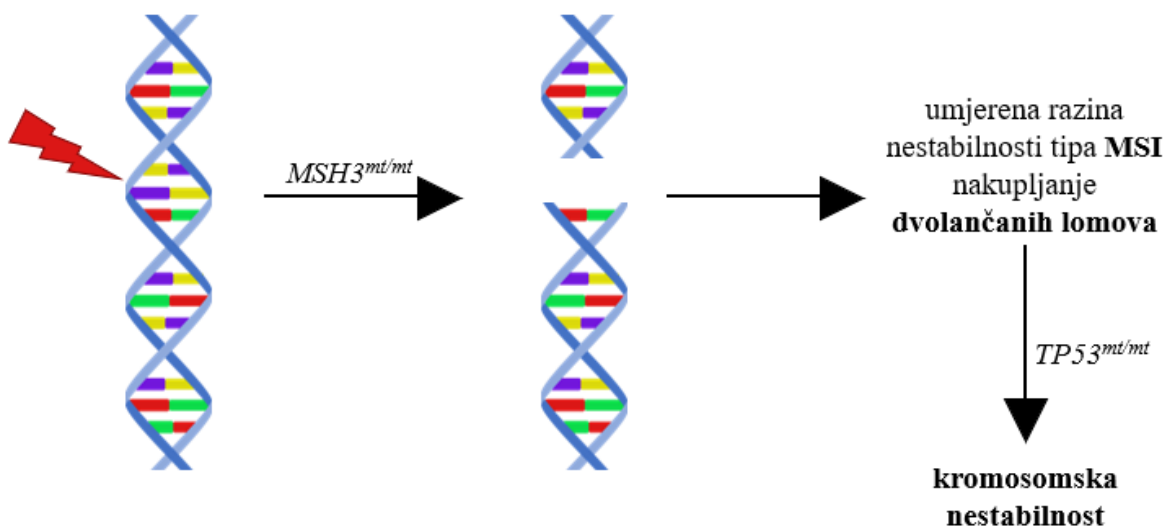
U eksonu 24 gena *MSH3* nalazi se funkcionalni polimorfizam rs26279 (+3133A/G) čiji je alel A prema nekim studijama povezan s većom predispozicijom za razvoj tumora debelog crijeva [66–68]. Polimorfizam se nalazi u sekvenci koja kodira za ATP-aznu aktivnost proteina hMSH3, preciznije, između dva konzervirana motiva koji okružuju mjesto vezanja ATP-a [69]. ATP-azna aktivnost proteina hMSH3 ima ključnu ulogu u provjeri krivo sparenih baza prije inicijacije popravka DNA [69–72]. Za ovaj polimorfizam je također pokazano da ima ulogu u miotoničnoj distrofiji tipa 1 budući da osobe s genotipom AA ovog polimorfizma pokazuju sklonost ka višim razinama somatske varijabilnosti CAG-CTG trinukleotidnih ponavljanja [69].

## 1.4. Uloga proteina hMSH3 u popravku dvolančanih lomova

Novija istraživanja pokazuju da protein hMSH3 uz ulogu u popravku krivo sparenih baza također sudjeluje i u popravku dvolančanih lomova tijekom faze S i G<sub>2</sub> staničnog ciklusa [21,50,73,74]. Stoga gubitak funkcije proteina hMSH3 predstavlja složeni deficit u popravku DNA koji uz poremećaj popravka krivo sparenih baza uključuje i popravak dvolančanih lomova [61]. U studijama *in vitro* na staničnim linijama karcinoma kolona (HCT116 i SW480) pokazano je da stanice kojima nedostaje protein hMSH3 (mutiran *MSH3* i utišan gen *MSH3*) nakupljaju više fosforiliranog oblika histona H2A.X ( $\gamma$ H2AX) nakon tretmana oksaliplatinom [75,76]. Fosforilacija serina na položaju 139 histona H2A.X jedan je od najbolje istraženih biljega oštećenja DNA u viših eukariota. Na mjestu dvolančanog loma najprije dolazi do vezanja i aktivacije kinaza ATM (od engl. *ataxia telangiectasia mutated*), ATR (od engl. *ataxia telangiectasia and Rad3 related*) i DNA-PK (od engl. *DNA dependent protein kinase*) [77]. Ove kinaze potom fosforiliraju serin na položaju 139 histona H2A.X [78]. Stoga je fosforilirani H2A.X jedan od prvih proteina koji se akumulira na mjestima dvolančanih lomova DNA te je uključen u njihov popravak mehanizmima homologne rekombinacije (HR, od engl. *homologous recombination*) i nehomolognim sparivanjem krajeva lanaca DNA (NHEJ od engl. *non-homologous end joining*) [79].

Na staničnim linijama karcinoma debelog crijeva pokazano je da popravak unakrsnih veza u DNA (engl. *crosslink*), koje nastaju uslijed interkalacije cisplatine u dvolančanu DNA, uvelike ovisi o prisutnosti proteina hMSH3. Bitno je naglasiti da učinkovitost homologne rekombinacije u popravku ovih oštećenja ovisi o MutS $\beta$ , ali ne i o MutS $\alpha$  ili hMLH1. Stoga, stanice u kojima je dokinuta funkcija proteina hMSH3 imaju smanjenu sposobnost popravljivanja dvolančanih lomova [75,76]. Dietlien i sur. (2014) su na modelu *in vitro*, koristeći različite tumorske stanične linije, uključujući i stanice karcinoma debelog crijeva, pokazali da uslijed mutacije gena *MSH3* dolazi do otežanog vezanja proteina RAD51 na mjesto dvolančanog loma te posljedično izostanka popravka putem homologne rekombinacije. Međutim, stanice s nefunkcionalnim proteinom hMSH3 su i dalje bile sposobne popravljati oštećenja uzrokovana etopozidom, vjerojatno korištenjem alternativnih puteva popravka dvolančanih lomova poput NHEJ [74]. Burdova i sur. (2015) su pokazali da MutS $\beta$  kompleks posreduje u vezanju

ATR/ATRIP-a na strukturu petlje koja je formirana unutar jednolančane DNA tijekom popravka dvolančanog loma. Stoga je MutSβ potreban u ranoj fazi popravka dvolančanih lomova mehanizmom homologne rekombinacije. Kada je MutSβ odsutan (zbog nefunkcionalnih proteina hMSH2 ili hMSH3) stanice se oslanjaju na korištenje mehanizma nehomolognog sparivanja krajeva lanaca DNA za preživljavanje u prisutnosti dvolančanih lomova [80]. Također je pokazano da su transgenični miševi s nefunkcionalnim proteinom hMSH3 uz pojavu umjerene razine mikrosatelitne nestabilnosti razvijali tumore s povećanim gubitkom heterozigotnosti (LOH od engl. *loss of heterozygosity*). Nadalje, gubitak funkcije proteina hMSH3 udružen s gubitkom funkcije proteina p53 doprinosi porastu varijacija u broju ponavljanja (CNV od engl. *copy number variation*). Oba navedena fenomena, LOH i CNV, predstavljaju obilježja kromosomske nestabilnosti odnosno gubitka funkcije popravka dvolančanih lomova (Slika 8) [73].



**Slika 8.** Uloga hMSH3 u popravku dvolančanih lomova.

Dakle u stanicama s nefunkcionalnim proteinom hMSH3 dolazi do djelomičnog gubitka funkcije sustava MMR i povećanja broja nepopravljenih dvolančanih lomova, što može dovesti do aneuploidije i gubitka heterozigotnosti. Stoga možemo reći kako gubitkom funkcije proteina hMSH3 dolazi do složenog poremećaja u popravku DNA. Jedan od navedenih, ili čak oba



poremećaja popravka DNA, mogu biti ključni čimbenici u nastanku tumora, uključujući i formiranje metastaza [81].

## 1.5. Signalni put interleukina-6 i njegova uloga u tumorigenezi

Tumori predstavljaju heterogenu skupinu stanica čiji mikrookoliš uz tumorske stanice sačinjavaju stanice strome te stanice urođene i stečene imunosti [5,82]. Osim stanica, mikrookoliš tumora uključuje i izvanstanični matriks u kojem su prisutne različite molekule poput citokina, kemokina, čimbenika rasta i sl. [83]. Ovisno o brojnosti i aktivaciji različitih tipova stanica u mikrookolišu tumora te ovisno o prisutnosti različitih kemokina i citokina rezultirajuća upala može imati protumorski ili antitumorski učinak [5].

Kronična upala je mehanizam koji se nalazi u podlozi nastanka niza tumora uključujući i tumore debelog crijeva [82]. Jedan od ključnih medijatora kronične upale je pleiotropni citokin interleukin-6 (IL-6) [84]. Različiti tipovi stanica eksprimiraju IL-6 uključujući T limfocite, B limfocite, monocite, fibroblaste, keratinocite, endotelne stanice te nekoliko vrsta tumorskih stanica [85]. Povišene razine IL-6 su uočene u oboljenjima koja su povezana s kroničnom upalom poput upalnih bolesti crijeva te su također dokazane i u nizu hematoloških i solidnih tumora uključujući i karcinom debelog crijeva [86,87]. Naime, u oboljelih od karcinoma debelog crijeva prisutne su povišene razine IL-6 i u serumu, ali i u tkivu tumora [87,88]. Visoke razine ovog citokina u serumu povezane su s lošijom prognozom oboljelih u slučaju metastatskog karcinoma debelog crijeva [89].

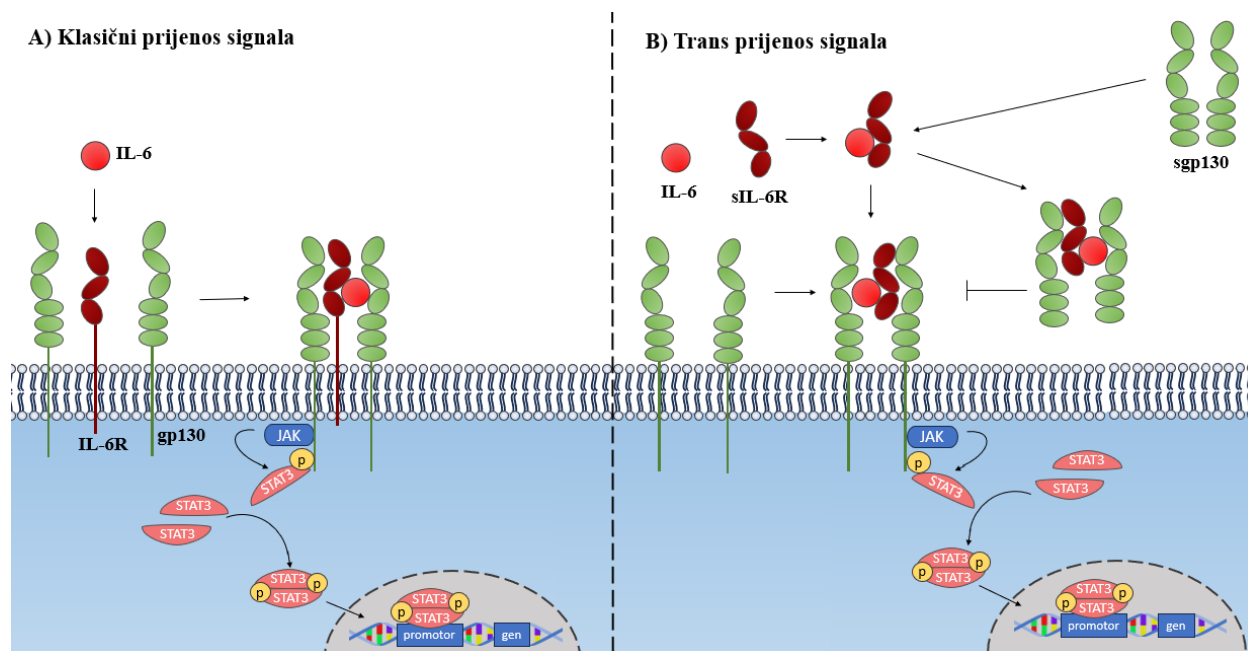
Smatra se da su glavni izvor interleukina-6 u mikrookolišu tumora debelog crijeva makrofagi pridruženi tumoru (od engl. *tumor-associated macrophages*), mezenhimske matične stanice (od engl. *mesenchymal stem cells*) i fibroblasti pridruženi tumoru (od engl. *colon cancer-associated fibroblasts*) [89]. Međutim, izvor IL-6 mogu biti i same tumorske stanice pa je tako ekspresija IL-6 dokazana primjerice u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva (SW480 i Caco-2) [90].

Prijenos signala putem IL-6 odvija se preko transmembranskog receptora za IL-6 (IL-6R) koji se nalazi na membrani svega nekoliko tipova stanica, uključujući monocite, makrofage, neutrofile, T limfocite, B limfocite, te hepatocite [91]. IL-6R je glikoprotein od 80 kDa koji

nakon vezanja IL-6 formira kompleks s koreceptorom gp130 [92]. Dakle, za prijenos signala dalje u stanicu neophodan je i koreceptor gp130, glikoprotein od 130 kDa koji je prisutan na širokom spektru stanica uključujući i epitelne stanice crijeva [84,93]. Nakon homodimerizacije gp130, dolazi do vezanja i aktivacije kinaze JAK (od engl. *Janus tyrosine kinase*) u citoplazmi, koja zatim fosforilira gp130. Nakon toga slijedi vezanje i fosforilacija transkripcijskog faktora STAT3 (od engl. *signal transducer and activator of transcription 3*), koji se zatim odvaja od koreceptora gp130 te ulazi u jezgru kao homodimer i potiče transkripciju ciljnih gena (Slika 9) [84].

Osim kao transmembranski protein (mIL-6R), receptor za IL-6 prisutan je i u topivom obliku (sIL-6R). Topivi oblik IL-6R nastaje uglavnom proteolitičkim cijepanjem izvanstanične domene transmembranskog IL-6R ili u manjoj mjeri alternativnim prekrajanjem *IL-6R* mRNA (izostavljen je ekson koji kodira za transmembransku domenu) [94,95]. Stoga, obzirom na oblik IL-6R razlikujemo dva tipa prijenosa signala: klasični, putem transmembranskog IL-6R, te trans signalni put, u kojem interleukin-6 stvara kompleks sa sIL-6R [96]. Smatra se da klasični signalni put prvenstveno ima ulogu u procesima tkivne regeneracije, dok trans signalni put, ovisno o staničnom i tkivnom kontekstu, može imati proupalni i protumorigeni učinak [97]. Budući da je gp130 prisutan na širokom spektru stanica, prijenos signala putem trans signalnog puta može dovesti do stimulacije gotovo svake stanice u tijelu [98]. Na membrani stanica debelog crijeva nije dokazana prisutnost IL-6R te nema konsenzusa radi li se o tome da nema ekspresije receptora ili se eksprimirani receptor brzo uklanja s membrane cijepanjem u solubilni oblik. Stoga se smatra kako je sva signalizacija putem IL-6 u stanicama debelog crijeva zapravo trans signalizacija [97]. Također, smatra se da upravo trans signalni put ima značajnu ulogu u razvoju karcinoma debelog crijeva [88,99].

Koreceptor gp130 također može biti prisutan u topivom obliku (sgp130), koji veže kompleks IL-6/sIL-6R te sprječava interakciju s membranskim gp130 i prijenos signala u stanicu [84]. Topivi oblik gp130 nastaje translacijom alternativno prekrojene mRNA i djeluje kao inhibitor trans signalnog puta [97,100].



**Slika 9.** Signalni put interleukina-6. A) Klasični prijenos signala putem membranskog receptora IL-6 (mIL-6R) koji je prisutan samo na određenim tipovima stanica. B) Trans prijenos signala u kojem topivi oblik receptora IL-6R (sIL-6R) veže IL-6, te kompleks IL-6/sIL-6R može aktivirati gotovo sve stanice u tijelu budući da je koreceptor gp130 široko prisutan na membranama mnogih tipova stanica. Izrađeno prema [84].

Oba signalna puta (klasični i trans) potiču prethodno opisanu unutarstaničnu aktivaciju JAK-STAT3 kaskade. Konačni učinak ove signalizacije ovisi o specifičnom tipu stanica i kontekstu u kojem se signalizacija odvija [99]. Upravo aktivacija transkripcijskog faktora STAT3 predstavlja ključan korak za transformaciju i napredovanje tumorskih stanica putem aktivacije specifičnih ciljnih gena. Naime, STAT3 potiče ekspresiju gena koji su uključeni u stanično preživljenje (*Bcl-2* i *survin*), proliferaciju (*c-Myc*, *ciklin D1* i *ciklin B*), angiogenezu (*HIF1alpha*, *VEGF*), razgradnju izvanstaničnog matriksa (*MMP2* i *MMP9*), adheziju stanica (*ICAM-1*) te upalu (*IL-6*, *IL-17*, *IL-23* i *Cox2*) [87]. Bollrath i sur. (2009) su pokazali da aktivacija STAT3 preko gp130 ima ulogu u regulaciji preživljenja epitelnih stanica u ovisnosti o IL-6. Također pokazano je i kako IL-6 kojeg luče tumorske stanice djeluje kao čimbenik rasta te inducira proliferaciju i preživljavanje tih i drugih tumorskih stanica [101].

### 1.5.1. Funkcionalni polimorfizmi u genima signalnog puta IL-6

Prijenos signala putem IL-6 reguliran je razinom i prisutnošću IL-6 kao i sIL-6R, gp130 i sgp130 te je stoga konačni učinak signalizacije putem ovog citokina vrlo kompleksan. Dodatnu složenost u ovaj sustav regulacije uvode funkcionalni polimorfizmi koji modificiraju razinu ekspresije i/ili funkcije pojedinih komponenti. Ovi su polimorfizmi opisani za IL-6, ali i za njegov receptor i koreceptor.

Tako je za IL-6 u literaturi opisan polimorfizam promotora gena *IL-6*, na poziciji -174 gdje dolazi do zamjene gvanina s citozinom (rs1800795) [102]. Rezultati istraživanja razine cirkulirajućeg IL-6 u ovisnosti o genotipu polimorfizma *IL-6* -174 G/C pokazali su da nosioci genotipa GG imaju niže razine IL-6 u serumu u odnosu na nosioce genotipa C (GC i CC) [103]. Također, u literaturi je prisutno niz studija koje povezuju ovaj polimorfizam sa sklonošću obolijevanja od različitih tumora. Međutim, rezultati ovih studija su neujednačeni i često proturječni najčešće zbog premalog uzorka ispitanika, različitih kriterija pri odabiru sudionika studije, metoda genotipizacije kao i različitog etniciteta ispitanika [104]. U kontekstu karcinoma debelog crijeva studija koju su proveli Theodoropoulos i sur. (2006) pokazala je da je alel C povezan sa smanjenom podložnošću obolijevanja od karcinoma debelog crijeva, dok je studija koju su proveli Landi i sur. (2003) pokazala povećanu podložnost obolijevanju od karcinoma debelog crijeva kod nosioca alela C [105,106].

U genima koji kodiraju za receptor *IL-6R* te koreceptor *gp130* opisani su funkcionalni polimorfizmi povezani s povećanim razinama topivih oblika IL-6R i gp130. Funkcionalni polimorfizam rs2228145 (stara oznaka rs8192284) u eksonu 9 gena za *IL-6R* je glavni čimbenik koji određuje razinu topivog oblika IL-6R u humanom serumu. Radi se o transverziji adenina u citozin na poziciji +48892 u kodirajućoj sekvenci što rezultira supstitucijom asparginske kiseline alalinom na poziciji 358 u polipeptidnom lancu [107–109]. Na uzorku zdravih ispitanika utvrđeno je da je alel C ovog polimorfizma povezan s dvostruko većom razinom sIL-6R u serumu u odnosu na osobe koje nisu nosioci ovog alela [108,109]. Naime ovaj polimorfizam nalazi se u sekvenci koja kodira za mjesto cijepanja IL-6R putem proteaze ADAM10 i ADAM17 te pogoduje nastanku više razine sIL-6R [107]. Funkcionalni polimorfizam rs3729960 (+148G/C) u genu za koreceptor gp130 utječe na razinu sgp130. Naime na uzorku zdravih

ispitanika pokazano je da nosioci C alela imaju više razine sgp130 u serumu u odnosu na homozigote divljeg tipa alela (GG) [110].

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Uloga mikrosatelitne nestabilnosti tipa EMAST u nastanku i napredovanju sporadičnih karcinoma debelog crijeva bilo samostalno ili kada se javlja udružena s nestabilnosti tipa MSI nije u potpunosti razjašnjena. Ova nestabilnost se povezuje s gubitkom funkcije proteina hMSH3 koji uz ulogu u popravku putem sustava MMR također sudjeluje i u popravku dvolančanih lomova. Kao jedan od glavnih čimbenika koji doprinosi nastanku nestabilnosti tipa EMAST predložen je interleukin-6. Zbog toga je cilj ovog istraživanja bio:

- 1) Ispitati ekspresiju proteina hMSH3 i IL-6 na uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva s obzirom na prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI i EMAST.
- 2) Ispitati status funkcionalnih polimorfizama gena *MSH3*, *IL-6*, *IL-6R* i *gp130* u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva te dobivene rezultate analizirati s obzirom na prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI i EMAST.
- 3) Ispitati ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X, biljega prisutnosti dvolančanih lomova DNA, na uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI i EMAST.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Uzorci

Uzorci korišteni u ovome radu dio su Hrvatske banke tumora koja se nalazi u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković". Kvaliteta uzoraka osigurana je obzirom na kriterije prikupljanja i pohrane [111]. Podaci o patohistološkoj dijagnozi, veličini tumora, stupnju diferencijacije te kliničkom stadiju prema Dukes-u mogli su se koristiti zahvaljujući bazi podataka dostupnoj pri Hrvatskoj banci tumora. Korištenje spomenutih uzoraka odobreno je od strane etičkog povjerenstva, a ispitanici su dali svoju suglasnost potpisivanjem pristanka za sudjelovanje u istraživanju. U ovom radu je analizirano 196 sporadičnih karcinoma debelog crijeva te pripadajuće normalne sluznice koja je uzeta na 15 cm udaljenosti od ruba tumora čime se osigurava da taj uzorak predstavlja nepromijenjeno tkivo. Istraživanjem je obuhvaćeno 75/196 (38,3 %) žena i 121/196 (61,7 %) muškaraca u rasponu od 21 do 87 godina starosti (srednja životna dob 67 godina).

Prethodnim istraživanjem na ovim uzorcima analizirana je prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI korištenjem konsenzusnog panela mono- i dinukleotidnih mikrosatelitnih biljega, poznatog kao Bethesda panel (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 i D17S250) [26]. Prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti tipa EMAST ispitana je korištenjem tetranukleotidnih mikrosatelitnih biljega koji se najčešće primjenjuju u ovom tipu istraživanja (MYCL1, D9S242, D20S82, D8S321 i D20S82) [27].

Na osnovi ovog probira, uzorci su razvrstani u sljedeće skupine:

- Skupina S - stabilni tumori u kojima nije opažena prisutnost nestabilnosti niti na jednom od analiziranih mikrosatelitnih biljega za detekciju nestabilnosti MSI i EMAST
- Skupina M – tumori u kojima je bila opažena prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti na nekom od mononukleotidnih biljega (BAT25, BAT26) udružena s promjenama na nekom od ostalih biljega korištenih u analizi nestabilnosti MSI i/ili EMAST

- Skupina E – tumori u kojima su opažene promjene na nekom od biljega za detekciju nestabilnosti tipa EMAST i tumori gdje su promjene na EMAST biljezima udružene s promjenama na nekom od dinukleotidnih biljega (D2S123, D5S346 i D17S250)

Od ukupnog broja uzoraka (196) uključenih u studiju 115 ih je pripadalo skupini S, 26 skupini M te 55 skupini E.

### **3.2. Izolacija DNA iz tkiva**

Ukupna genomska DNA izolirana je iz komadića normalne sluznice odnosno tumorskog tkiva pacijenata oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva koje je homogenizirano u puferu za izolaciju DNA (10 mM Tris Cl, 0.1 M EDTA, pH 8.0, 0.5 % SDS) (Kemika, Hrvatska). U homogenizirane uzorke dodana je proteinaza K (koncentracije 20 µg/ml, Sigma, Sjedinjene Američke Države) do koncentracije 100 µg/ml. Suspenzija je dobro promiješana pomoću tresilice i inkubirana preko noći na +37 °C. Na suspenziju koja je ohlađena na sobnoj temperaturi dodan je jednaki volumen fenola (Kemika, Hrvatska). Laganim miješanjem u trajanju od 10 minuta dvije su faze izmiješane u emulziju. Faze su zatim razdvojene centrifugiranjem na 1000 x g kroz 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Gornja (vodena) faza je izdvojena u novu sterilnu epruvetu. Postupak pročišćavanja fenolom ponovljen je još dva puta. Vodena faza je potom pročišćena s tri volumena smjese kloroform-izoamilni alkohol u omjeru 24:1 (Kemika, Hrvatska). Iz pročišćene vodene faze precipitirana je DNA dodavanjem 1000 µl hladnog (-20 °C) apsolutnog etanola (Kemika, Hrvatska). Nakon centrifugiranja 1 minutu uklonjen je etanol, a talog DNA je kratko posušen na 37 °C, otopljen u puferu TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) (Kemika, Hrvatska) i pohranjen na +4 °C.



### 3.3. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija DNA određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 260 nm. Pomoću izmjerene optičke gustoće izračunata je koncentracija DNA prema formuli:

$$y = OD \times R \times \varepsilon$$

gdje je:

- o  $\gamma$  – masena koncentracija ( $\mu\text{g/ml}$ )
- o OD – optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm
- o R – razrjeđenje u kiveti
- o  $\varepsilon$  – ekstinkcijski koeficijent za DNA ( $50 \mu\text{g/ml}$ )

Čistoća dobivene DNA provjerena je omjerom očitavanja na 260 i 280 nm (OD260/OD280) koji za čistu DNA iznosi od 1.8 do 2.0.

### 3.4. Elektroforeza u gelu agaroze

Produkti reakcija lančane reakcije polimerazom (PCR od engl. *Polymerase Chain Reaction*) i PCR-RFLP (od engl. *Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism*) analizirani su u 2.5 %-tnom gelu agaroze (Sigma, Njemačka). Za elektroforezu je korišten 1xTAE pufer (50xTAE: 40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA, pH 8.0) koji se koristio i za izradu gela. Za vizualizaciju produkata ovih reakcija u gelove dodana je fluorescentna boja MidoriGreen (Nippon Genetics Europe GmbH, Njemačka). Veličina umnoženog odsječka određena je prema DNA standardu IX ( $\Phi\text{X}/\text{HaeIII}$ ) (Promega, SAD). Elektroforeza se odvijala pri naponu od 100 V, 30-40 minuta. Za detekciju i fotografiranje gelova korišten je transiluminator UVItec Alliance 4.7 (UVItec Limited, UK).

### 3.5. Elektroforeza u gelu poliakrilamida

Razdvajanje produkata reakcije PCR i PCR-RFLP za određene polimorfizme provedeno je elektroforezom u 10 %-tnom nenedaturirajućem gelu poliakrilamida koji se sastojao od mješavine akrilamid (Sigma): N, N' metilen bisakrilamid (Sigma) u omjeru 29:1, pufera 5 x TBE (45mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH8), N,N,N,N',N' - tetrametildietil-diamin (TEMED) (Sigma) i amonijev persulfat (Sigma). Na gel veličine 35x30 cm naneseo je 10 µl produkata reakcije PCR odnosno 12,5 µl produkata reakcije RFLP pomiješanog s puferom za uzorke. Elektroforeza se odvijala pri stalnom naponu od 800 V. Rezultat elektroforeze prikazan je bojanjem gela srebrom [112]. Ukratko, postupak bojenja gela sastojao se od fiksacije u 10 % etanolu tijekom 30 minuta, oksidacije u 1 % dušičnoj kiselini tijekom 10 minuta, redukcije kationa srebra u 0,2 % otopini srebrovog nitrata tijekom 30 minuta u tami, postupnog razvijanja u smjesi 3 %-tne otopine natrijeva karbonata i 37 %-tnog formaldehida te zaustavljanja reakcije u 5 %-tnoj otopini octene kiseline. Veličina odsječka određena je prema DNA standardu pBR322/*MspI* (New England, BioLabs, SAD).

### 3.6. Analiza polimorfizama u genu *MSH3*

Polimorfizam repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* [61] analiziran je umnažanjem produkata metodom PCR te njihovim razdvajanjem u gelu poliakrilamida, dok je metodom PCR-RFLP analiziran SNP (od engl. *single nucleotide polymorphism*) polimorfizam: *MSH3* +3133A/G (NCBI | rs26279) [113].

#### 3.6.1. Analiza polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3*

Polimorfizam repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* analiziran je umnažanjem ciljne regije gena metodom PCR. Za umnažanje ove repetitivne sekvence korišteni su parovi specifičnih početnih oligonukleotida koji su prikazani u Tablici 1. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µl sastojala se od 5 µl 5x PCR pufera (Promega, SAD), 1,5 µl magnezijeva klorida

(Promega, SAD), smjese nukleotida (dATP, dTTP, dCTP i dGTP, 50  $\mu$ M svaki) (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), početnih oligonukleotida (200 nM svaki), 200 ng DNA, 0,25  $\mu$ l DNA polimeraze GoTaq® (Promega, SAD) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena reakcijske smjese. PCR reakcija se sastojala od 35 ponavljajućih ciklusa s tri faze: denaturacija DNA na 95 °C, sparivanje početnica na 55 °C i produženje lanaca na 72 °C, pri čemu je svaka faza trajala 30 sekundi. Produkti dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u 2.5 %-tnom gelu agaroze.

**Tablica 1.** Temperatura sparivanja i početni oligonukleotidi korišteni u reakciji PCR.

Polimorfizam	Temperatura sparivanja	Početni oligonukleotidi
Repetitivna sekvenca u eksonu 1 gena <i>MSH3</i>	55 °C	5' TGA GCC GAT TCT TCC AGT CTA CGG G 3' 5' CCC AGT CCC AGA CAG AAC CTA CTA 3'

### 3.6.1.1. Analiza produkata reakcije PCR elektroforezom u gelu poliakrilamida

Analiza polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* provedena je razdvajanjem dobivenih produkata reakcije PCR elektroforezom u 10 % nedenaturirajućem gelu poliakrilamida. Ukratko, na poliakrilamidni gel nanoseno je 10  $\mu$ L produkta reakcije PCR pomiješanih s puferom za uzorke. Elektroforeza je trajala 3 sata i 30 minuta pri stalnom naponu od 800 V. Za vizualizaciju fragmenata u gelu korištena je metoda bojanja srebrom.

### 3.6.2. Analiza polimorfizma *MSH3* +3133A/G

Polimorfizam *MSH3* +3133A/G analiziran je korištenjem metodom PCR-RFLP. Parovi specifičnih početnih oligonukleotida koji su korišteni za umnažanje ciljnih regija u genomu su prikazani u Tablici 2.

**Tablica 2.** Temperatura sparivanja i početni oligonukleotidi korišteni u reakciji PCR.

SNP	Temperatura sparivanja	Početni oligonukleotidi
<i>MSH3</i> +3133A/G	55 °C	5' TTT CAG CTT TCA GGC ACA GTT 3' 5' CCT TCC AGC TCT TTT GAC TT 3'

### **3.6.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)**

Reakcija PCR provedena je u ukupnom volumenu od 25  $\mu$ l. Reakcijska smjesa sastojala se od 5  $\mu$ l 5x PCR pufera (Promega, SAD), 1,5  $\mu$ l magnezijeva klorida (Promega, SAD), smjese nukleotida (dATP, dTTP, dCTP i dGTP, 50  $\mu$ M svaki) (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), početnih oligonukleotida (200 nM svaki), 200 ng DNA, 0,25  $\mu$ l DNA polimeraze GoTaq® (Promega, SAD) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena. Reakcija se odvijala u 35 ciklusa s tri faze: denaturacija DNA na 95 °C, sparivanje početnica na 55 °C i produženje lanaca na 72 °C, svaka faza trajala je 30 sekundi. Produkti dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u 2.5 %-tnom gelu agaroze.

### **3.6.2.2. Reakcija RFLP**

Polimorfizam *MSH3* +3133A/G analiziran je metodom RFLP pri čemu je produkt reakcije PCR izložen djelovanju restrikcijske endonukleaze *HhaI* (New England, BioLabs, SAD). Ukratko, na 10  $\mu$ l produkta reakcije PCR dodana je 1 jedinica enzima, 2,5  $\mu$ l komercijalno dostupnog pufera za taj enzim te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena reakcijske smjese od 25  $\mu$ l koja je zatim inkubirana preko noći pri temperaturi od 37 °C.

### **3.6.2.3. Analiza produkata reakcije RFLP elektroforezom u gelu agaroze**

Razdvajanje produkata reakcije *RFLP* za polimorfizam *MSH3* +3133A/G provedeno je elektroforezom u 2,5 %-tnom gelu agaroze. Ukratko, 12,5  $\mu$ l produkata reakcije RFLP pomiješanih s puferom za uzorke nanoseno je na gel agaroze te su fragmenti razdvajani pri naponu od 100 V u trajanju od 30 do 45 minuta.

## **3.7. Analiza polimorfizama jednog nukleotida u signalnom putu IL-6**

U analizi polimorfizama jednog nukleotida korištene su metode PCR-RFLP, i metoda reakcije PCR u stvarnom vremenu (*real-time* PCR-SNP).

### 3.7.1. PCR-RFLP

Metodom PCR-RFLP analizirani su sljedeći polimorfizmi: *IL-6R* +48892A/C (NCBI | rs2228145) [114], te *gp130* +148G/C (NCBI | rs3729960) [110].

Parovi specifičnih početnih oligonukleotida korišteni za umnažanje željenih odsječaka gena prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Temperatura sparivanja i početni oligonukleotidi korišteni u reakciji PCR.

SNP	Temperatura sparivanja	Početni oligonukleotidi
<i>IL-6R</i> +48892A/C	52 °C	5' CCT CTT TGT GCC TTG TG 3' 5' ATG GAT TAC CTC TTC GTG TC 3'
<i>gp130</i> +148G/C	52 °C	5' TGC CTC CAG AAA AAC CTA AA 3' 5' CAT TCA GAT TTT AAA GTG AAG 3'

#### 3.7.1.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Reakcija PCR se odvijala u volumenu od 25 µl kojeg je sačinjavalo 5 µl 5x PCR pufera (Promega, SAD), 1,5 µl magnezijeva klorida (Promega, SAD), smjesa nukleotida (dNTP tj. dATP, dTTP, dCTP i dGTP 50 µM svaki) (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), početni oligonukleotidi (200 nM svaki), 200 ng DNA, 0,25 µL DNA polimeraze *GoTaq*® (Promega, SAD) te QH<sub>2</sub>O. Svaki od 35 ciklusa reakcije PCR sastojao se od 3 faze. Faza denaturacije DNA je trajala 30 sekundi na 95 °C, faza sparivanja početnica je trajala 30 sekundi na adekvatnoj temperaturi koja je navedena za svaki polimorfizam (Tablica 3), te faza produženja lanaca koja je trajala 30 sekundi na 72 °C. Produkti dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u 2.5 %-tnom gelu agaroze.

#### 3.7.1.2. Reakcija RFLP

Analiza polimorfizma *IL-6R* +48892A/C, te *gp130* +148G/C provedena je metodom RFLP. Za određivanje statusa alela na temelju prisutnosti polimorfnog mjesta, produkt reakcije PCR je pocijepan odgovarajućim restrikcijskim enzimom. U reakcijsku smjesu ukupnog volumena 25 µl dodano je 10 µl produkta reakcije PCR te je u slučaju analize polimorfizma

*gp130* +148 G/C, dodana 1 jedinica enzima *MboI* (New England, BioLabs, SAD), 2,5 µl komercijalno dostupnog pufera pripadajućeg enzimu te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena, dok je za analizu polimorfizma *IL-6R* +48892 A/C na 10 µl produkta reakcije PCR dodana je 1 jedinica enzima *HinfI* (Promega, SAD), 2,5 µl komercijalno dostupnog pufera pripadajućeg enzimu, 0,25 µl BSA (od engl *Bovine serum albumin*) i QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena reakcijske smjese koja je zatim preko noći ostavljena na inkubaciji pri temperaturi od 37 °C.

#### **3.7.1.3. Analiza produkata reakcije RFLP elektroforezom u gelu agaroze**

Razdvajanje produkata reakcije RFLP za polimorfizam *IL-6R* +48892A/C provedeno je elektroforezom u 2,5 %-tnom gelu agaroze. Ukratko, 12,5 µl produkata reakcije RFLP pomiješanih s puferom za uzorke nanoseno je na gel agaroze te su fragmenti razdvajani pri naponu od 100 V tijekom 30-45 minuta.

#### **3.7.1.4. Analiza produkata reakcije RFLP elektroforezom u gelu poliakrilamida**

Razdvajanje produkata reakcije RFLP za polimorfizam *gp130* +148G/C provedeno je elektroforezom u 10 %-tnom nenedenaturirajućem gelu poliakrilamida. Ukratko, na gel je nanoseno 12,5 µL produkata reakcije RFLP koji su prethodno pomiješani s puferom za uzorke te su fragmenti razdvajani 2 sata pri konstantnom naponu od 800 V. Za prikaz fragmenata reakcije RFLP u gelu koristila se metoda bojenja srebrom.

### **3.7.2. Real-time PCR-SNP**

Metodom *real-time* PCR-SNP analiziran je polimorfizam *IL-6* -174G/C (NCBI | rs1800795). Za analizu ovog polimorfizma korišten je komercijalno dostupan *TaqMan*® *SNP* esej za genotipizaciju *c\_1839697\_20* (Applied Biosystems, SAD). Reakcijska smjesa se sastojala od 100 ng DNA, 1,25 µl eseja *Taqman*® *SNP Assay* (Applied Biosystems, SAD), 12,5 µl *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix*-a (Applied Biosystems, SAD) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena reakcijske smjese od 25 µl. Reakcija PCR odvijala se pri sljedećim uvjetima: 50 °C kroz 2 min, 95 °C kroz 10 min te 40 ciklusa od 92 °C 15 s te 60 °C 1 min. Produkti reakcije analizirani su na uređaju *7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, SAD) pomoću programa *7300 System SDS Software* za određivanje alela.

### 3.8. Analiza mutacija u genu *TP53*

Prisutnost najčešćih mutacija u genu *TP53*, (tzv. *hotspot* mutacija) analizirana je korištenjem metode PCR-RFLP te metode fluorescentne detekcije heterodupleksa (HRM, od engl. *High Resolution Melting*)

#### 3.8.1. PCR-RFLP

Metodom PCR-RFLP analizirana je prisutnost mutacija u kodonu 175 eksona 5 (R175) i kodonu 248 eksona 7 (R248) gena *TP53*.

Parovi specifičnih početnih oligonukleotida korišteni za umnažanje ciljne regije u genomu su prikazani u Tablici 4.

**Tablica 4.** Temperatura sparivanja i početni oligonukleotidi korišteni u reakciji PCR.

Mutacija <i>TP53</i>	Temperatura sparivanja	Početni oligonukleotidi
R175	55 °C	5' TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT 3' 5' CAG CCC TGT CGT CTC TCC 3'
R248	60 °	5' CCT CAT CTT GGG CCT GTG TT 3' 5' CCA GGG GTC AGC GGC AAG CA 3'

##### 3.8.1.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Reakcija PCR provedena je u reakcijskoj smjesi koja je sačinjena od 5 µl 5x PCR pufera (Promega, SAD), 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (Promega, SAD), smjese nukleotida (dATP, dTTP, dCTP i dGTP, 50 µMsvaki) (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), početnih oligonukleotida (200 nM svaki), 200 ng DNA, 0,25 µl DNA polimeraze GoTaq® (Promega, SAD) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena reakcijske smjese od 25 µL. Svaki od 35 ciklusa reakcije PCR sastojao se od 3 faze: denaturacija DNA koja je trajala 30 sekundi na 95 °C, sparivanje početnica tijekom 30 sekundi na adekvatnoj temperaturi određenoj za svaki par početnih oligonukleotida (Tablica 4), i

produženje lanaca tijekom 30 sekundi na 72 °C. Produkti dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u 2.5 %-tnom gelu agaroze.

### **3.8.1.2. Reakcija RFLP**

Prisutnost mutacija R175 i R248 u genu *TP53* analizirana je metodom RFLP pri čemu je produkt reakcije PCR izložen djelovanju odgovarajuće restrikcijske endonukleaze. U analizi R175 korišten je restrikcijski enzim *CfoI* (Promega, SAD) dok je za analizu R248 korišten restrikcijski enzim *MspI* (Promega, SAD). Ukratko, na 10 µl PCR produkta dodana je 1 jedinica odgovarajućeg enzima, 2,5 µl komercijalno dostupnog enzimu odgovarajućeg pufera, 0,25 µl BSA i QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena reakcijske smjese od 25 µl koja je zatim preko noći ostavljena na inkubaciji pri temperaturi od 37 °C.

### **3.8.1.3. Analiza produkata reakcije RFLP elektroforezom u gelu poliakrilamida**

Razdvajanje produkata reakcije RFLP za detekciju mutacija R175 i R248 u genu *TP53* provedeno je elektroforezom u 10 %-tnom nedenaturirajućem gelu poliakrilamida. Ukratko, na gel je nanoseno 12,5 µL produkata reakcije RFLP koji su prethodno bili pomiješani s puferom za uzorke te su fragmenti razdvajani 2 sata pri konstantnom naponu od 800 V. Za prikaz fragmenata u gelu koristila se metoda bojenja srebrom.

## **3.8.2. Fluorescentna detekcija heterodupleksa (HRM)**

Metoda fluorescentne detekcije heterodupleksa (HRM, od engl. *High Resolution Melting*) temelji se na modificiranoj PCR reakciji koja uz uobičajene sastojke reakcijske smjese uključuje i fluorescentnu boju, te na denaturaciji dobivenog produkta reakcije PCR.

Parovi specifičnih početnih oligonukleotida korišteni za umnažanje ciljane regije u genomu prikazani su u Tablici 5.



**Tablica 5.** Temperatura sparivanja i početni oligonukleotidi korišteni u reakciji PCR.

Mutacija <i>TP53</i>	Temperatura sparivanja	Početni oligonukleotidi
R273	61 °C	5' GAC CTG ATT TCC TTA CTG CCT CTT G 3' 5' AAT CTG AGG CAT AAC TGC ACC CTT 3'

### 3.8.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Reakcija PCR provedena je u ukupnom volumenu od 25 µl. Reakcijska smjesa uključivala je 2,5 µl 5x PCR pufera (Promega, SAD), 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (Promega SAD), smjesu nukleotida (dNTP tj dATP, dTTP, dCTP i dGTP, 50 µMsvaki) (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), početne oligonukleotide (200 nM svaki), 200 ng DNA, 1 µl fluorescentne boje LCGreen Plus+ (Idaho Technology Inc, SAD), 0,25 µl DNA polimeraze *GoTaq*® (Promega, SAD) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena reakcijske smjese. Reakcija odvijala se u 35 ciklusa pri čemu se svaki sastojao od 3 faze: denaturacija DNA u trajanju od 30 sekundi na 95 °C, faza sparivanja početnicau trajanju od 30 sekundi na 61 °C, te faza produljivanja lanaca u trajanju od 30 sekundi na 72 °C. Produkti dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u 2.5 %-tnom gelu agaroze.

### 3.8.2.2. Fluorescentna detekcija heterodupleksa (HRM)

Nakon umnažanja lančanom reakcijom polimeraze, 10 µl dobivenog PCR produkta je odvojeno u kapilaru, denaturirano 1 min pri 98 °C, te renaturirano 5 min pri 40 °C radi formiranja heterodupleksa. Zatim je uzorak prenesen u kapilaru te je dodano 5 µL parafinskog ulja radi sprječavanja hlapljenja reakcijske smjese. Tako pripremljeni uzorci analizirani su na instrumentu HR-1 (High resolution melter, Idaho Technology Inc, SAD). Uzorci su denaturirani u rasponu od 68-93 °C s prikupljanjem signala svakih 0.2 °C prilikom čega dolazi do otpuštanja fluorescentne boje te pada fluorescencije što se detektira pomoću instrumenta HR-1.

### 3.9. Analiza ekspresije proteina imunohistokemijskom metodom

Smještaj i ekspresija proteina analizirani su imunohistokemijskom metodom na parafinskim rezovima tkiva fiksiranih u 10 % -tnom puferiranom formalinu. Analiza se temeljila na reakciji peroksidaza-anti-peroksidaza uz korištenje primarnih mišjih monoklonskih protutijela na protein IL-6 (sc130326, 1:100) (Santa Cruz Biotechnology, SAD), MSH3 (klon B-4, 1:50) (Santa Cruz Biotechnology, SAD) i  $\gamma$ H2A.X (D7T2V, 1:200) (Cell Signaling Biotechnology, SAD).

Parafinski rezovi debljine 2  $\mu$ m na predmetnim stakalcima deparafinizirani su u ksilenu (Kemika, Hrvatska) te zatim rehidrirani u silaznim koncentracijama etanola (100 %  $\rightarrow$  90 %  $\rightarrow$  70 %  $\rightarrow$  50 %) (Kemika, Hrvatska). Nakon toga, preparati su isprani u fosfatnom puferu PBS (137 mM natrijev klorid , 2,7 mM kalijev klorid, 8,1 mM dinatrijev fosfat x 2 H<sub>2</sub>O, 1,76 mM monokalijev fosfat , pH 7,4) i fiksirani u metanolu (Kemika, Hrvatska). Radi blokiranja aktivnosti endogenih peroksidaza, u metanol za fiksiranje dodan je 3 % vodikov peroksid (Kemika, Hrvatska) te su parafinski rezovi inkubirani u ovoj smjesi 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Po završetku fiksacije preparati su ponovno isprani u PBS-u te je provedeno otkrivanje epitopa u citratnom puferu DAKO target retrieval pH 6.0 (Agilent DAKO, SAD) zagrijavanjem preparata u mikrovalnoj pećnici 2 puta po 5 minuta pri 750 W te zadnjim zagrijavanjem pri 500 W u trajanju od 5 minuta. Stakalca su potom hlađena na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta, a zatim su isprana u PBS-u. Nespecifično vezanje je blokirano DAKO® Protein Block Serum-Free (Agilent DAKO, SAD) u vlažnoj komori tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Na preparate je zatim nakapano jedno od korištenih primarnih mišjih monoklonskih protutijela u sljedećim koncentracijama: IL-6 (1:100), MSH3 (1:50) ili  $\gamma$ H2A.X (1:200). Preparati su zatim preko noći inkubirani s primarnim protutijelom u vlažnoj komori pri 4 °C. Po isteku inkubacije stakalca su isprana 3 puta u PBS-u. U imunohistokemijskoj analizi proteina IL-6 i MSH3, preparati su inkubirani sa sekundarnim mišjim monoklonskim protutijelom DAKO EnVision™+System, HRP (Agilent DAKO, SAD), dok su u imunohistokemijskoj analizi proteina  $\gamma$ H2A.X preparati inkubirani sa sekundarnim mišjim monoklonskim protutijelom *SignalStain Boost IHC Detection Reagent* (HRP, Mouse) (Cell Signaling Biotechnology, SAD). U oba slučaja, inkubacija u sekundarnom protutijelu je trajala

30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije preparati su isprani 3 puta u PBS-u. Za vizualizaciju pozitivne reakcije preparati su inkubirani sa supstratom za vizualizaciju DAKO *Liquid DAB+ Substrate\_Chromogen System* (DAB- diaminobenzidin) (Agilent DAKO, SAD). Jezgre su obojane hematoksilinom (Biognost, Hrvatska) kroz 3 min te je boja razvijena u hladnoj vodovodnoj vodi. Preparati su potom dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (50 % → 70 % → 90 % → 100 %) i u ksilenu te trajno uklopljeni u medij za uklapanje entelan (Entellan, Sigma-Aldrich, SAD).

Svaki rez je analiziran u cjelokupnom području tumora te su rezultati izraženi kao pozitivna ili negativna reakcija u slučaju proteina IL-6, dok su u slučaju proteina hMSH3 i  $\gamma$ H2A.X rezultati izraženi kao udio negativnih (plavo obojenje) odnosno pozitivnih (smeđe obojenje) jezgara.

U svrhu određivanja udjela negativnih jezgara u analizi ekspresije proteina hMSH3, slikana su tri vidna polja na povećanju 100x te su u svakom od navedenih polja prebrojane jezgre koje su bile negativne odnosno pozitivne na ekspresiju proteina MSH3. Ukupni zbroj negativnih jezgara u odnosu na ukupan broj jezgara svih vidnih polja predstavljao je udio negativnih jezgara za pojedini uzorak.

U svrhu određivanja udjelajezgara pozitivnih na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X, slikana su tri vidna polja na povećanju 100x. U svakom od ovih polja, brojane su jezgre pozitivne i negativne na  $\gamma$ H2A.X. Ukupan broj pozitivnih jezgara u odnosu na ukupan broj jezgara, svih vidnih polja predstavljao je udio pozitivnih jezgara za pojedini uzorak.

### 3.10. Statistika

Rezultati istraživanja prikazani su uz pomoć tablica, slika i grafikona. Za statističku analizu razlike u vrijednostima kvalitativnih varijabli primijenjen je Fisherov egzakti test, a za kvantitativne varijable t-test.

Jednadžba Hardy-Weinberg za neovisne uzorke korištena je kako bi se utvrdilo je li opažena raspodjela genotipova pojedinog polimorfizma unutar analiziranih skupina u skladu s očekivanim vrijednostima izračunatim na temelju frekvencija pojedinih alela.

Usporedbe između pojedinih skupina provedene su Fisherovim egzaktnim testom te je  $p < 0,05$  smatran statistički značajnim. Statistička obrada rezultata prikazana pomoću tablica kontigencije učinjena je Fisherovim egzaktnim testom za neovisne uzorke.

Za potrebe statističke analize u ovom radu korišten je softver GraphPad Prism (GraphPad Prism Software, verzija 8.0.2 (263), SAD).

## 4. REZULTATI

U ovom istraživanju tumori su podijeljeni u tri skupine na temelju prisutnosti nestabilnosti na mikrosatelitnim biljezima. Prva skupina, označena kao skupina S, obuhvaća tumore kod kojih nisu opažene promjene na bilo kojem od analiziranih mikrosatelitnih biljega. S druge strane, skupina M predstavlja tumore kod kojih je detektirana mikrosatelitna nestabilnost, na mononukleotidnim biljezima (BAT25 i BAT26) udružena s promjenama na drugim biljezima za analizu nestabilnosti MSI i/ili EMAS. Konačno, skupina E obuhvaća tumore gdje su opažene promjene na nekom od biljega za detekciju nestabilnosti tipa EMAS i tumore gdje su promjene na EMAS biljezima bile povezane s promjenama na nekom od dinukleotidnih biljega (D2S123, D5S346 i D17S250).

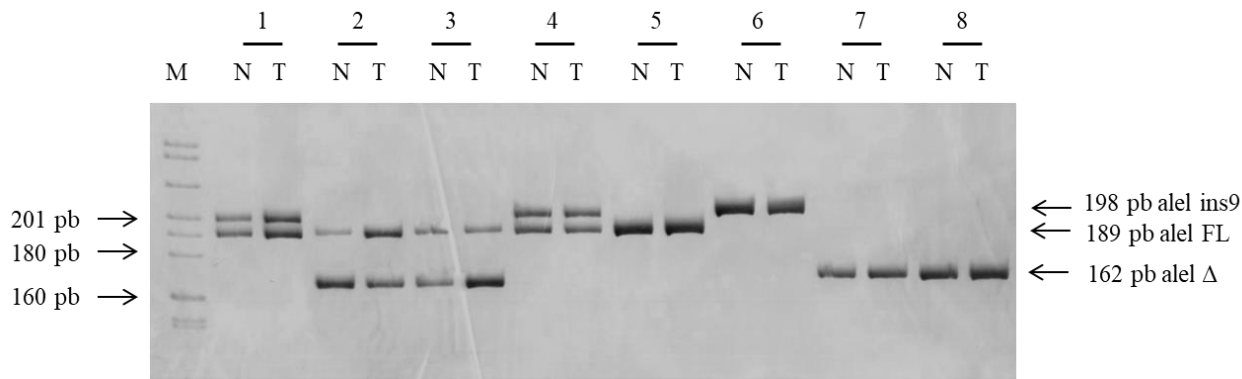
### 4.1. Analiza funkcionalnih polimorfizama gena *MSH3*

U cilju ispitivanja uloge hMSH3 u tumorigenezi sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti analizirana je učestalost dva funkcionalna polimorfizama u genu *MSH3*. Polimorfna repetitivna sekvenca u eksonu 1 gena *MSH3* može imati sterički utjecaj na dostupnost signala za smještaj hMSH3 u jezgri te je ispitana učestalost pojedinih alela i genotipova ove sekvence obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. Također smo analizirali učestalost polimorfizma *MSH3* +3133A/G, koji se nalazi u regiji koja kodira za ATP-aznu aktivnost proteina hMSH3 obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

#### 4.1.1. Analiza polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3*

Analiza polimorfizama repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* provedena je na uzorcima genomske DNA izolirane iz 196 parova tkiva tumora i pridružene normalne sluznice debelog crijeva oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Status funkcionalnog polimorfizma, repetitivne sekvence od 9 pb u prvom eksonu gena *MSH3* analiziran je umnažanjem ciljne regije gena metodom lančane reakcije polimerazom korištenjem specifičnih oligonukleotidnih početnica. Uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom produkata u

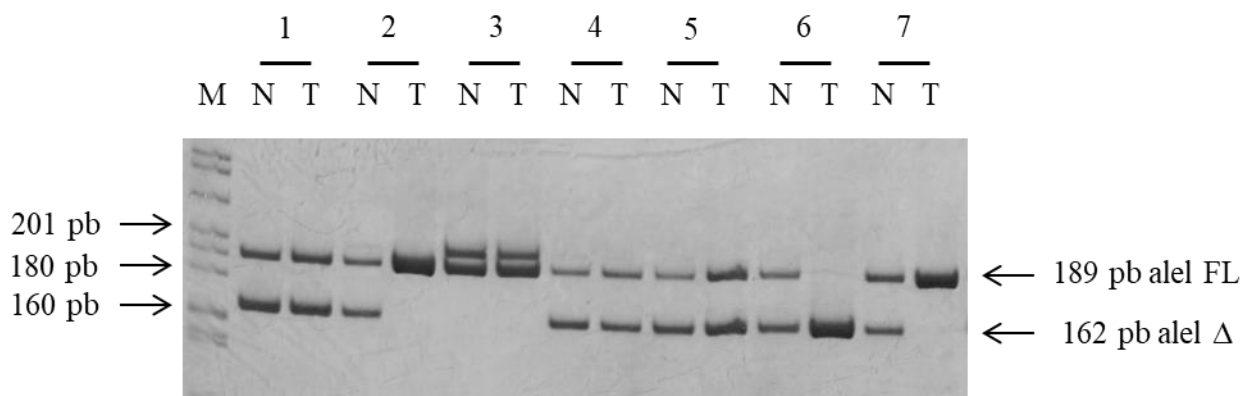
2,5 %-tnom gelu agaroze te su zatim fragmenti s različitim brojem ponavljanja razdvojeni elektroforezom u 10 %-tnom nedenaturirajućem gelu poliakrilamida. U našem uzorku opaženi su sljedeći aleli:  $\Delta$  (162 pb), del9 (180 pb), FL (189 pb), ins4 (193 pb), ins9 (198 pb) te ins18 (207 pb) (Slika 10).



**Slika 10.** Analiza polimorfizma repetitivne sekvence u prvom eksonu gena *MSH3* u 10 %-tnom nedenaturirajućem gelu poliakrilamida, M, DNA standard pBR322/*MspI* (New England, BioLabs); 1,4 heterozigotni uzorci (genotip FL/ins9); 2,3 heterozigotni uzorci (genotip  $\Delta$ /FL); 5 homozigotni uzorak (genotip FL/FL); 7, 8 homozigotni uzorci (genotip  $\Delta$ / $\Delta$ ); 6 homozigotni uzorak (genotip ins9/ins9); N, normalno tkivo; T, tumor.

#### 4.1.1.1. Analiza promjena u genotipu polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3*

U našem uzorku uočene su promjene u genotipu polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* u tkivu tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu u vidu gubitka nekog od alela. Analiza gubitka alela polimorfne repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* provedena je analizom gubitka heterozigotnosti (LOH, od engl. *loss of heterozygosity*) na 95/196 (48.4 %) parova tumora i pripadajuće normalne sluznice koji su bili informativni za ovaj biljeg. Gubitak nekog od alela uočen je u 27,4 % (26/95) informativnih tumora (Slika 11).



**Slika 11.** Analiza promjena u genotipu polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* u 10 %-tnom nedenaaturirajućem gelu poliakrilamida, M, DNA standard pBR322/*MspI* (New England, BioLabs); 1, 4, 5 heterozigotni uzorci (genotip  $\Delta$ /FL); 2, 7 heterozigotni uzorci (genotip  $\Delta$ /FL) u kojima je opažen gubitak alela  $\Delta$  tkivu tumora; 3 heterozigotni uzorak (genotip FL/ins9); 6 heterozigotni uzorak (genotip  $\Delta$ /FL) u kojemu je opažen gubitak alela FL tkivu tumora; N, normalno tkivo; T, tumor.

Najčešća promjena u tumorima bio je gubitak alela  $\Delta$  odnosno promjena genotipa  $\Delta$ /FL u FL/FL koja je uočena u 17/26 (65,4 %) informativnih tumora u kojima je uočen gubitak nekog alela. Kada se analizira gubitak alela ovog polimorfizma po skupinama obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti, u skupini S najčešća promjena u tumorima bio je gubitak alela  $\Delta$  prisutna u 12/19 (63,2 %) uzoraka kao i u skupini E gdje je gubitak alela  $\Delta$  bio prisutan u 5/7 (71,4 %) uzoraka. U skupini M nije uočen gubitak alela polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* niti u jednom od analiziranih uzoraka. Ostali gubici alela prikazani su u Tablici 6.

**Tablica 6.** Gubitak heterozigotnosti (LOH) polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva u ukupnom uzorku te obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

	Ukupni uzorak n=26	Skupina S n=19	Skupina M n=0	Skupina E n=7
Gubitak alela u tumoru	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
alel $\Delta$	17 (65,4)	12 (63,2)	0	5 (71,4)
alel FL	5 (19,2)	4 (21,1)	0	1 (14,3)
alel ins9	3 (11,5)	3 (15,7)	0	0 (0)
alel del9	1 (3,9)	0 (0)	0	1 (14,3)

#### 4.1.1.2. Analiza učestalosti pojedinih alela i genotipova polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3*

Analizom učestalosti obuhvaćeni su najučestaliji aleli FL (referentni alel),  $\Delta$  i ins9, te najučestaliji genotipovi FL/FL (referentni genotip),  $\Delta$ /FL,  $\Delta$ / $\Delta$  i FL/ins9 budući da je pojavnost drugih alela i genotipova bila utvrđena sporadično u manjem broju uzoraka te su stoga oni i isključeni iz daljnje analize (Tablica 7).

**Tablica 7.** Genotipovi polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva.

Polimorfizam repetitivne sekvence u eksonu 1 gena <i>MSH3</i>	Ukupni uzorak n=196
Genotip	n (%)
FL/FL	86 (44)
$\Delta$ /FL	44 (22,5)
$\Delta$ / $\Delta$	24 (12,2)
FL/ins9	19 (9,7)
del9/FL	5 (2,6)
$\Delta$ /FL /ins9	4 (2)
$\Delta$ /ins9	3 (1,5)
FL/ins18	3 (1,5)
ins9/ins9	3 (1,5)
FL/ins4	1 (0,5)
ins9/ins18	2 (1)
ins18/ins18	1 (0,5)
del9/ $\Delta$	1 (0,5)

U Tablici 8 prikazani su rezultati analize učestalosti pojedinih alela i genotipova polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* provedene na uzorcima tkiva tumora. Kada su analizirani aleli i genotipovi nije utvrđena statistički značajna razlika u njihovoj raspodjeli između pojedinih skupina obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

Rezultati dobiveni analizom polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* korelirani su s obzirom na kliničko-patološke pokazatelje oboljelih i njihovih tumora uključujući



dob, spol, smještaj tumora, veličinu tumora, stupanj diferencijacije te stadij tumora po Dukes' -u. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova u odnosu na kliničko-patološke karakteristike tumora u ispitivanim skupinama s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

**Tablica 8.** Učestalost alela i genotipova polimorfizma repetitivne sekvence u prvom eksonu gena *MSH3* opaženih u tkivu tumora oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

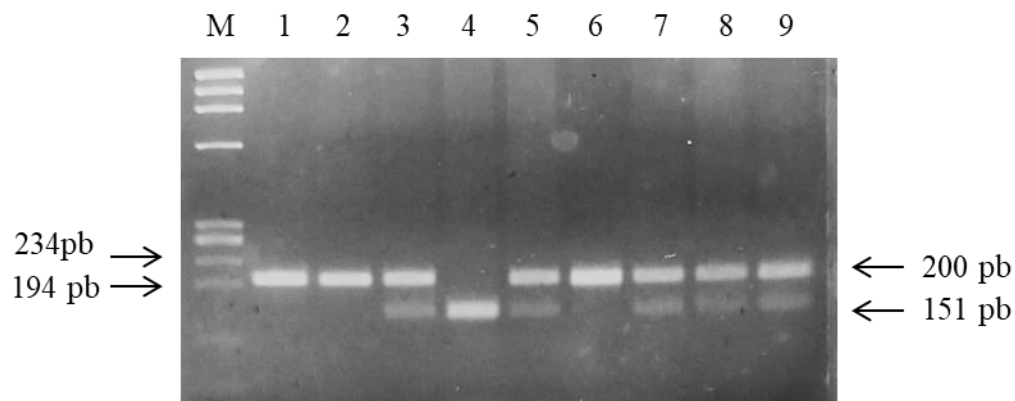
Polimorfizam repetitivne sekvence u eksonu 1 gena <i>MSH3</i>	Skupina S n=99			Skupina E n=50			Skupina M n=24		
	Skupina S n=99	Skupina M n=24	p	Skupina S n=99	Skupina E n=50	p	Skupina M n=24	Skupina E n=50	p
Genotip	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<b>FL/FL</b>	49 (49,5)	13 (54,2)	-	49 (49,5)	24 (48)	-	13 (54,2)	24 (48)	-
$\Delta$ /FL	28 (28,3)	3 (12,5)	0,247	28 (28,3)	13 (26)	>0,999	3 (12,5)	13 (26)	0,333
$\Delta$ / $\Delta$	11 (11,1)	5 (20,8)	0,506	11 (11,1)	8 (16)	0,589	5 (20,8)	8 (16)	>0,999
<b>FL/ins9</b>	11 (11,1)	3 (12,5)	>0,999	11 (11,1)	5 (10)	>0,999	3 (12,5)	5 (10)	>0,999
<b>Aleli</b>									
<b>FL</b>	137 (69,2)	32 (66,6)	-	137 (69,2)	66 (66)	-	32 (66,6)	66 (66)	-
$\Delta$	50 (25,3)	13 (27,1)	0,852	50 (25,3)	29 (29)	0,575	13 (27,1)	29 (29)	>0,999
<b>ins9</b>	11 (5,5)	3 (6,3)	0,733	11 (5,5)	5 (5)	>0,999	3 (6,3)	5 (5)	>0,999

p-vrijednosti su izračunate Fisherovim egzaktnim testom \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

#### 4.1.2. Analiza polimorfizma *MSH3* +3133A/G

Polimorfizam *MSH3* +3133A/G analiziran je metodom PCR-RFLP. Odsječak ciljne regije u kojoj se nalazi kodirajuća sekvenca za ekson 24 gena *MSH3* umnožen je pomoću para specifičnih oligonukleotidnih početnica, uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom produkata u 2,5 %-tnom gelu agaroze te je dobivena vrpca veličine 200 pb.

Dobiveni produkti reakcije PCR pocijepani su uz pomoć restrikcijskog enzima *HhaI* kako bi se utvrdio status alela. Odsječci dobiveni reakcijom RFLP razdvojeni su elektroforezom u 2,5 %-tnom gelu agaroze. Alel G posjeduje restrikcijsko mjesto za *HhaI* te se u reakciji RFLP cijepa na odsječke veličine 49 i 151 pb. Alel A ne posjeduje ovo restrikcijsko mjesto te ne dolazi do cijepanja ovog alela u reakciji RFLP već on ostaje u punoj veličini od 200 pb (Slika 12).



**Slika 12.** Analiza polimorfizma *MSH3* +3133A/G u 2,5 %-tnom gelu agaroze.

M, DNA standard IX ( $\Phi$ X/*HaeIII*) (Promega); 1, 2, 6 homozigotni uzorak (genotip AA); 3, 5, 7- 9 heterozigotni uzorak (genotip AG); 4 homozigotni uzorak (genotip GG).

Ukupno je analizirano 196 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Frekvencije opaženih genotipova bile su u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom. Dobiveni rezultati analizirani su obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti.

Nije opažena statistički značajna razlika u raspodjeli pojedinih genotipova obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti u tkivu tumora. Rezultati analize prikazani su u Tablici 9.

**Tablica 9.** Učestalost alela i genotipova polimorfizma *MSH3* +3133A/G u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

<i>MSH3</i> +3133A/G	skupina S		p	skupina S		p	skupina E		p
	n=115	skupina E n=55		n=115	skupina M n=26		n=55	skupina M n=26	
Genotip	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
AA	56 (48,7)	28 (50,9)	-	56 (48,7)	16 (61,5)	-	28 (50,9)	16 (61,5)	-
AG	52 (45,2)	27 (49,1)	>0,999	52 (45,2)	8 (30,8)	0,257	27 (49,1)	8 (30,8)	0,226
GG	7 (6,1)	0	0,095	7 (6,1)	2 (7,7)	>0,999	0	2 (7,7)	0,148
<b>Aleli</b>									
A	164 (71,3)	83 (75,5)	-	164 (71,3)	40 (76,9)	-	83 (75,5)	40 (76,9)	-
G	67 (28,7)	27 (24,5)	0,438	67 (28,7)	12 (23,1)	0,494	27 (24,5)	12 (23,1)	>0,999

p-vrijednosti su izračunate Fisherovim egzaktnim testom \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

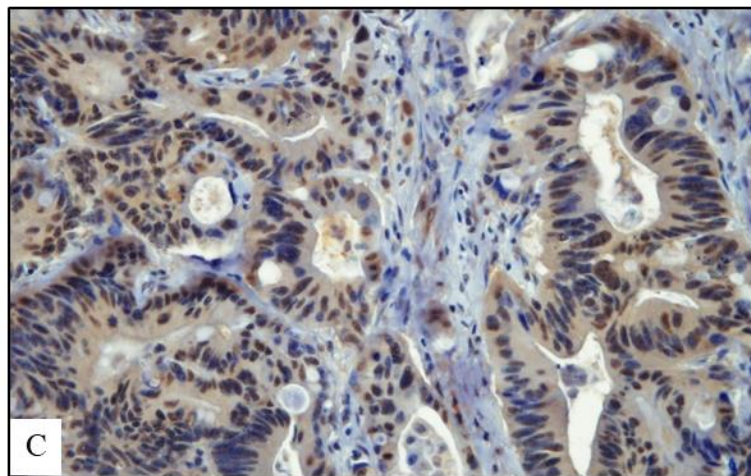
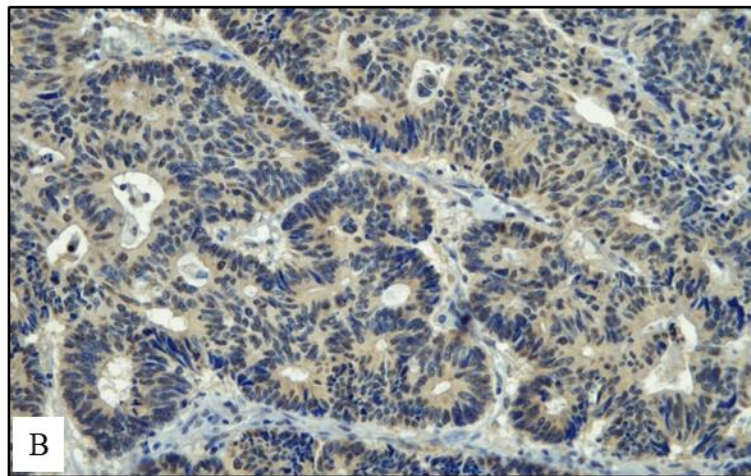
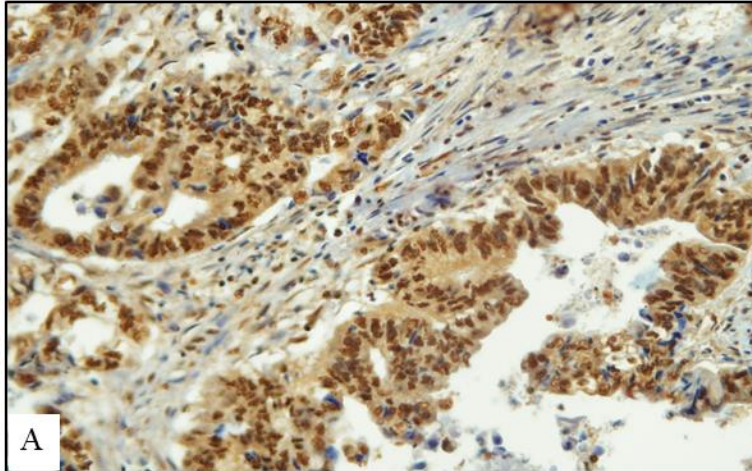
Dobiveni rezultati analize polimorfizma *MSH3* +3133A/G korelirani su s obzirom na kliničko-patološke karakteristike tumora i oboljelih, odnosno stupanj diferencijacije tumora, stadij tumora po Dukes'-u, smještaj i veličinu tumora, te dob i spol oboljelih. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova u odnosu na kliničko-patološke karakteristike tumora u ispitivanim skupinama s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

## **4.2. Analiza ekspresije proteina hMSH3**

Ekspresiju proteina hMSH3 ispitali smo imunohistokemijskom metodom na uzorku od 84 oboljela od sporadičnog karcinoma debelog crijeva za koje su nam bili dostupni rezovi tumorskog tkiva uklopljeni u parafin. Imunohistokemijska analiza provedena je metodom peroksidaza-anti-peroksidaza uz korištenje specifičnih mišjih monoklonskih protutijela na protein hMSH3.

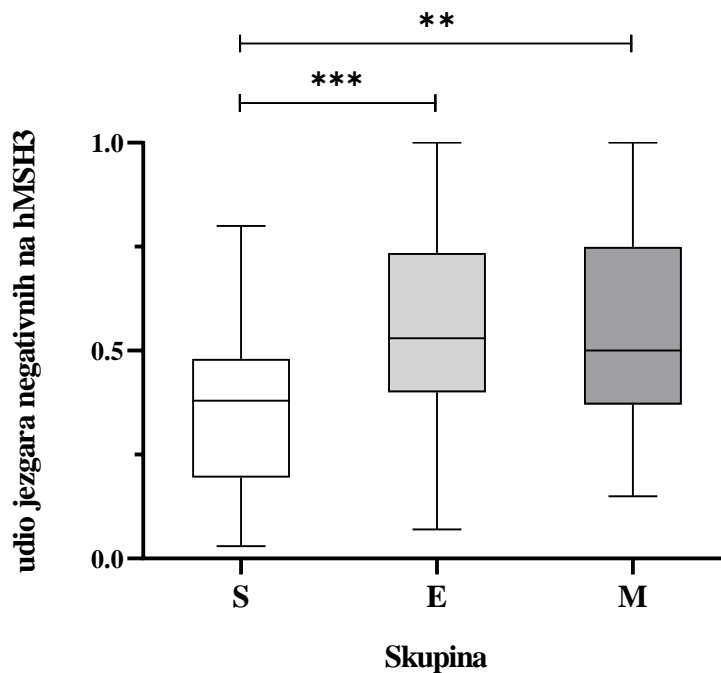
Obzirom na ulogu proteina hMSH3 u popravku putem sustava MMR analizirana je njegova prisutnost u jezgrama tumorskih stanica. Ukoliko je u jezgrama tumorskih stanica bilo prisutno smeđe obojenje, one su smatrane pozitivnima na ekspresiju hMSH3. U dijelu uzoraka uočeno je plavo obojenje jezgara te su oni smatrani negativnima na ekspresiju proteina hMSH3. U pojedinim uzorcima uočena je heterogena ekspresija proteina hMSH3 u jezgrama tumorskih stanica tj. uočena je prisutnost i negativnih i pozitivnih jezgara (Slika 13).

Udio jezgara negativnih na ekspresiju proteina hMSH3 u svakom uzorku određen je brojanjem jezgara negativnih i pozitivnih na hMSH3u 3 vidna polja. Ukupni zbroj negativnih jezgara svih vidnih polja u odnosu na ukupan broj jezgara predstavljao je udio negativnih jezgara za pojedini uzorak.



**Slika 13.** Ekspresija proteina hMSH3 u sporadičnim tumorima debelog crijeva. A, smeđe jezgre tumorskih stanica pozitivne na protein hMSH3; B, jezgre tumorskih stanica negativne (plave) na protein hMSH3; C, heterogena ekspresija, prisutne i negativne i pozitivne jezgre tumorskih stanica na ekspresiju proteina hMSH3 u parafinskim preparatima adenokarcinoma debelog crijeva (povećanje 400x).

Kada su rezultati ekspresije proteina hMSH3 analizirani obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti uočena je statistički značajna razlika u udjelu jezgara tumorskih stanica negativnih na ekspresiju proteina hMSH3 između skupine S i skupine E ( $p=0,0007$ ). Veći prosječni udio jezgara tumorskih stanica negativnih na ekspresiju proteina hMSH3 opažen je u skupini E (medijan 0,56) u odnosu na prosječni udio u skupini S (medijan 0,36). Također, uočena je statistički značajna razlika u udjelu jezgara tumorskih stanica koje su bile negativne na ekspresiju proteina hMSH3 između skupine S i skupine M ( $p=0,008$ ). Pri tome je veći prosječni udio jezgara tumorskih stanica negativnih na ekspresiju proteina hMSH3 opažen u skupini M (medijan 0,54) u odnosu na prosječni udio u skupini S (medijan 0,36). Između skupine E i M nije uočena statistički značajna razlika obzirom na udio hMSH3 negativnih jezgara (Slika 14).



**Slika 14.** Udio jezgara tumorskih stanica koje su bile negativne na ekspresiju proteina hMSH3 u tkivu sporadičnih tumora debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. p-vrijednosti su izračunate nezavisnim t-testom \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

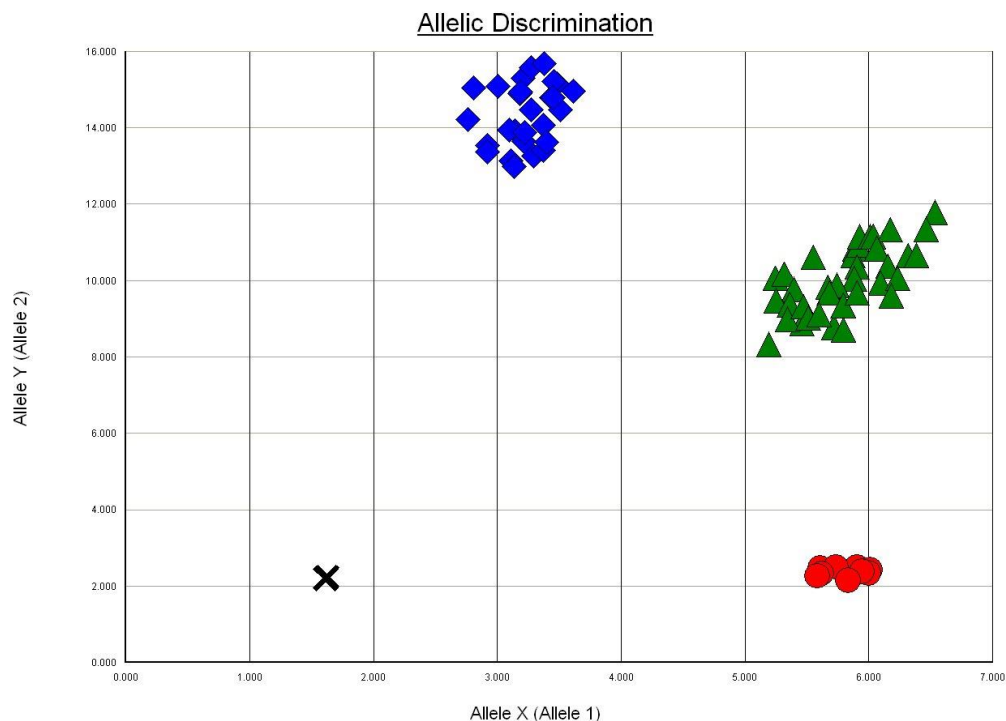
Dobiveni rezultati analize ekspresije proteina hMSH3 korelirani su s obzirom na kliničko-patološke karakteristike tumora i oboljelih, odnosno stupanj diferencijacije tumora, stadij tumora po Dukes'-u, smještaj i veličinu tumora, te dob i spol oboljelih te nije utvrđena statistički značajna razlika s obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti.

### 4.3. Analiza funkcionalnih polimorfizama u signalnom putu interleukina-6

U cilju ispitivanja uloge interleukina-6 u tumorigenezi sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti analizirana je učestalost funkcionalnih polimorfizama u tri komponente njegovog signalnog puta: interleukinu-6 (IL-6), njegovom receptoru (IL-6R) te koreceptoru (gp130).

#### 4.3.1. Analiza polimorfizma interleukin-6 -174 G/C

Polimorfizam *IL-6* -174G/C analiziran je metodom *real-time* PCR-SNP korištenjem specifičnih komercijalno dostupnih TaqMan<sup>®</sup> proba obilježenih fluorescentnim bojama za razlikovanje alela ovog polimorfizma (Slika 15).



**Slika 15.** Analiza polimorfizma *IL-6* -174G/C metodom *real-time* PCR-SNP. Analiza je provedena na uređaju ABI PRISM<sup>®</sup> 7300 Sequence Detection System (● homozigot C/C, ▲ heterozigot G/C, ◆ homozigot G/G), x – negativna kontrola.



Ukupno je analizirano 196 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Frekvencije opaženih genotipova bile su u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom. Dobiveni rezultati analizirani su obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti.

Opažen je trend u raspodjeli pojedinih genotipova između skupine S i E ( $p=0,051$ ). Nosioци genotipa CC su bili učestaliji u skupini E. Rezultati analize prikazani su u Tablici 10.

Dobiveni rezultati analize polimorfizma *IL-6* -174G/C korelirani su s obzirom na kliničko-patološke karakteristike tumora i oboljelih, odnosno stupanj diferencijacije tumora, stadij tumora po Dukes'-u, smještaj i veličinu tumora, te dob i spol oboljelih. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova u odnosu na kliničko-patološke karakteristike tumora u ispitivanim skupinama s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

**Tablica 10.** Učestalost alela i genotipova polimorfizma *IL-6* -174G/C u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

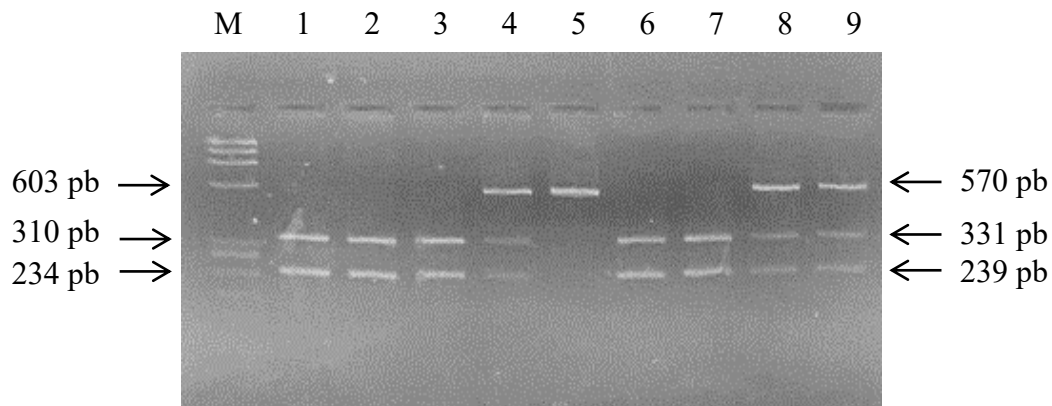
<i>IL-6</i> -174 G/C	Skupina S n=115	Skupina E n=55	p	Skupina S n =115	Skupina M n=26	p	Skupina M n=26	Skupina E n=55	p
Genotip	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<b>GG</b>	37 (32,2)	16 (29)	-	37 (32,2)	8 (30,8)	-	8 (30,8)	16 (29)	-
<b>GC</b>	66 (57,4)	25 (45,5)	0,848	66 (57,4)	14 (53,8)	>0,999	14 (53,8)	25 (45,5)	>0,999
<b>CC</b>	12 (10,4)	14 (25,5)	0,051	12 (10,4)	4 (15,4)	0,715	4 (15,4)	14 (25,5)	0,506
<b>Aleli</b>									
<b>G</b>	140 (60,9)	57 (51,8)	-	140 (60,9)	30 (57,7)	-	30 (57,7)	57 (51,8)	-
<b>C</b>	90 (39,1)	53 (48,2)	0,127	90 (39,1)	22 (42,3)	0,754	22 (42,3)	53 (48,2)	0,505

p-vrijednosti su izračunate Fisherovim egzaktnim testom \*p <0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

### 4.3.2. Analiza polimorfizma receptora interleukina-6 +48892A/C

Polimorfizam *IL-6R* +48892A/C analiziran je metodom PCR-RFLP. Odsječak ciljne regije u kojoj se nalazi kodirajuća sekvenca za receptor IL-6 umnožen je pomoću para specifičnih oligonukleotidnih početnica, uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom produkta u 2,5 %-tnom gelu agaroze te je dobivena vrpca veličine 710 pb.

Dobiveni produkti reakcije PCR pocijepani su uz pomoć restrikcijskog enzima *HinfI* kako bi se utvrdio status alela. Odsječci dobiveni reakcijom RFLP razdvojeni su elektroforezom u 2,5 %-tnom gelu agaroze. Alel C koji posjeduje dva restrikcijska mjesta za *HinfI* u reakciji RFLP se cijepa na odsječke veličine 66, 74 i 570 pb. Alel A posjeduje još jedno restrikcijsko mjesto za *HinfI*, na poziciji polimorfizma koji se ispituje te se u reakciji RFLP cijepa na odsječke veličine 66, 74, 239 i 331 pb (Slika 16).



**Slika 16.** Analiza polimorfizma *IL-6R* +48892A/C u 2,5 %-tnom gelu agaroze.

M, DNA standard IX ( $\Phi$ X/*HaeIII*) (Promega); 1-3,6,7 homozigotni uzorak (genotip AA); 4,8,9 heterozigotni uzorak (genotip AC); 5 homozigotni uzorak (genotip CC).

Ukupno je analizirano 196 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Frekvencije opaženih genotipova bile su u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom. Dobiveni rezultati analizirani su obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti te nije opažena statistički značajna razlika u raspodjeli pojedinih genotipova obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti u tkivu tumora. Rezultati analize prikazani su u Tablici 11.

Dobiveni rezultati analize polimorfizma *IL-6R* +48892A/C korelirani su s obzirom na kliničko-patološke karakteristike tumora i oboljelih, odnosno stupanj diferencijacije tumora, stadij tumora po Dukes'-u, smještaj i veličinu tumora, te dob i spol oboljelih. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova u odnosu na kliničko-patološke karakteristike tumora u ispitivanim skupinama s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

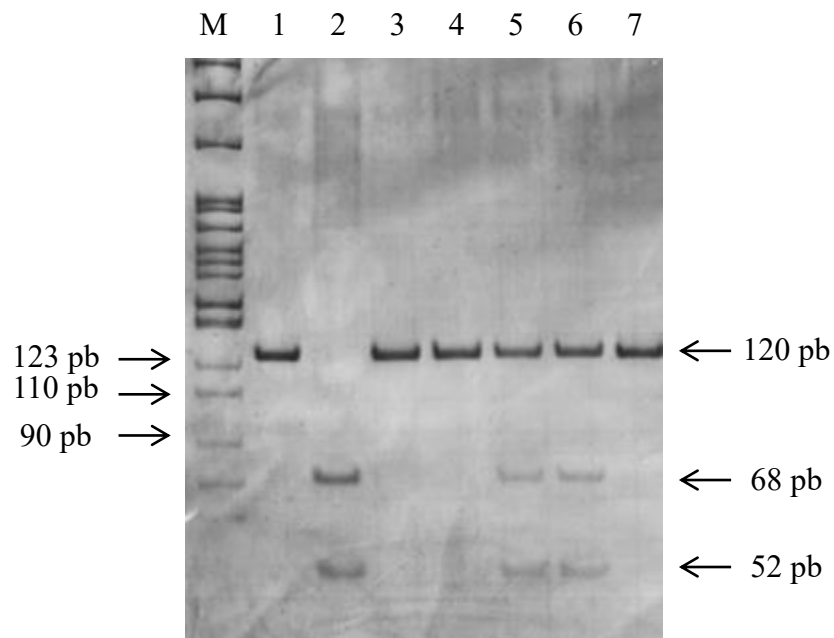
**Tablica 11.** Učestalost alela i genotipova polimorfizma *IL-6R* +48892 A/C u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

<i>IL-6R</i> +48892A/C	Skupina S n=115	Skupina E n=55	p	Skupina S n=115	Skupina M n=26	p	Skupina M n=26	Skupina E n=26	p
<b>Genotip</b>	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<b>AA</b>	48 (41,7)	23 (41,8)	-	48 (41,7)	9 (34,6)	-	9 (34,6)	23 (41,8)	-
<b>AC</b>	54 (47)	26 (47,2)	>0,999	54 (47)	17 (65,4)	0,278	17 (65,4)	26 (47,2)	0,336
<b>CC</b>	13 (11,3)	6 (11)	>0,999	13 (11,3)	0	0,193	0 (0)	6 (11)	0,303
<b>Aleli</b>									
<b>A</b>	150 (65,2)	72 (65,5)	-	150 (65,2)	35 (67,3)	-	35 (67,3)	72 (65,5)	-
<b>C</b>	80 (34,8)	38 (34,5)	>0,999	80 (34,8)	17 (32,7)	0,872	17 (32,7)	38 (34,5)	0,860
p-vrijednosti su izračunate Fisherovim egzaktnim testom *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001									

### 4.3.3. Analiza polimorfizma koreceptora *gp130* +148G/C

Polimorfizam *gp130* +148G/C analiziran je metodom PCR-RFLP. Odsječak ciljne regije u kojoj se nalazi kodirajuća sekvenca za koreceptor *gp130* umnožen je pomoću para specifičnih oligonukleotidnih početnica, uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom produkta u 2,5 %-tnom gelu agaroze te je dobivena vrpca veličine 120 pb.

Dobiveni produkti reakcije PCR pocijepani su uz pomoć restrikcijskog enzima *MboI* kako bi se utvrdio status alela. Odsječci dobiveni reakcijom RFLP razdvojeni su elektroforezom u 10 %-tnom gelu poliakrilamida. Alel C koji posjeduje restrikcijsko mjesto za *MboI* u reakciji RFLP se cijepa na odsječke veličine 52 i 68 pb. Alel G ne posjeduje ovo restrikcijsko mjesto pa se ne cijepa u reakciji RFLP (veličina 120 pb) (Slika 17).



**Slika 17.** Analiza polimorfizma *gp130* +148G/C u 10 %-tnom gelu poliakrilamida.

M, DNA standard pBR322/*MspI* (New England, BioLabs); 1, 3, 4, 7 homozigotni uzorak (genotip GG); 5, 6 heterozigotni uzorak (genotip GC); 2 homozigotni uzorak (genotip CC).

Ukupno je analizirano 196 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Frekvencije opaženih genotipova bile su u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom. Dobiveni rezultati analizirani su obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti.

Opažena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova u skupini E u odnosu na skupinu S. Homozigotni i heterozigotni nosioci varijantnog alela C (genotip GC+CC) su bili značajno manje učestali u skupini E u odnosu na skupinu S ( $p=0,037$ ). Nadalje, skupina E je imala nižu učestalost alela C u odnosu na skupinu S ( $p=0,031$ ). Rezultati analize prikazani su u Tablici 12.

Dobiveni rezultati analize polimorfizma *gp130* +148G/C korelirani su s obzirom na kliničko-patološke karakteristike tumora i oboljelih, odnosno stupanj diferencijacije tumora, stadij tumora po Dukes'-u, smještaj i veličinu tumora, te dob i spol oboljelih. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova u odnosu na kliničko-patološke karakteristike tumora u ispitivanim skupinama s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

**Tablica 12.** Učestalost alela i genotipova polimorfizma *gp130* +148G/C u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

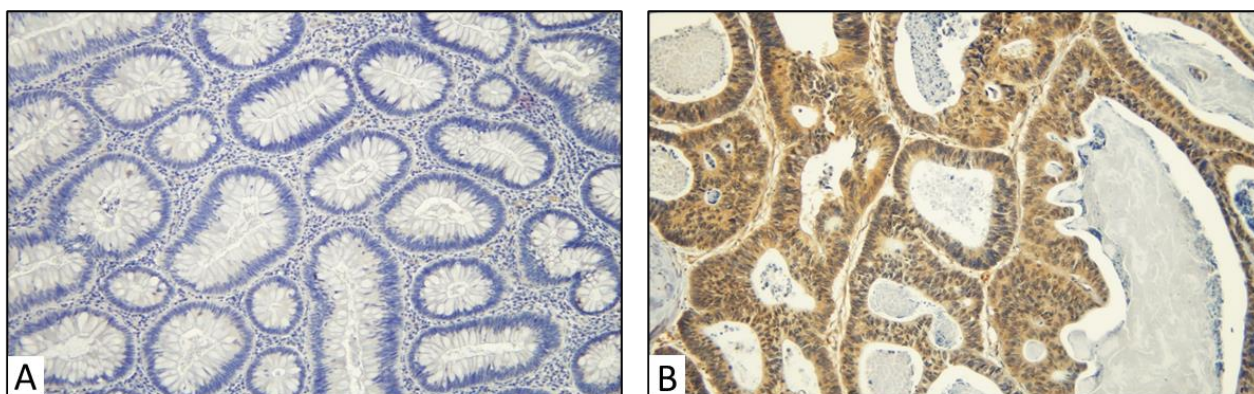
<i>gp130</i> +148G/C									
	Skupina S n=115	Skupina E n=55	p	Skupina S n=115	Skupina M n=26	p	Skupina M n=26	Skupina E n=55	p
Genotip	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<b>GG</b>	80 (69,6)	47 (85,5)	-	80 (69,6)	22 (84,6)	-	22 (84,6)	47 (85,5)	-
<b>GC+CC</b>	35 (30,4)	8 (14,5)	<b>0,037*</b>	35 (30,4)	4 (15,4)	0,149	4 (15,4)	8 (14,5)	>0,999
<b>Aleli</b>									
<b>G</b>	191 (83)	101 (91,8)	-	191 (83)	47 (90,4)	-	47 (90,4)	101 (91,8)	-
<b>C</b>	39 (17)	9 (8,2)	<b>0,031*</b>	39 (17)	5 (9,6)	0,212	5 (9,6)	9 (8,2)	0,769
p-vrijednosti su izračunate Fisherovim egzaktnim testom *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001									



#### 4.4. Analiza ekspresije proteina interleukin-6

Ekspresija proteina interleukin-6 ispitana je imunohistokemijskom metodom na uzorku od 84 oboljela od sporadičnog karcinoma debelog crijeva za koje su nam bili dostupni rezovi tumorskog tkiva uklopljeni u parafin. Imunohistokemijska analiza provedena je metodom peroksidaza-anti-peroksidaza, uz korištenje specifičnih mišjih monoklonskih protutijela na protein IL-6.

Analizom ekspresije proteina IL-6 u dijelu uzoraka uočena je pozitivna imunohistokemijska reakcija (smeđe obojenje) u citoplazmi tumorskih stanica. Rezultat analize ekspresije proteina IL-6 u tumorskim stanicama bio je definiran kao negativna ili pozitivna imunohistokemijska reakcija (Slika 18).



**Slika 18.** Ekspresija proteina IL-6 u sporadičnim tumorima debelog crijeva. A, negativna imunohistokemijska reakcija; B, pozitivna imunohistokemijska reakcija na IL-6 u parafinskim preparatima adenokarcinoma debelog crijeva (povećanje 200x).

Pozitivna imunohistokemijska reakcija na IL-6 bila je prisutna u 59/84 (70,2 %) analiziranih uzoraka. Analiza ekspresije proteina IL-6 obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji ovog proteina između pojedinih skupina (Tablica 13).

**Tablica 13.** Ekspresija proteina IL-6 u sporadičnim karcinomima debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

IL-6 protein	Skupina			Skupina			Skupina		
	S n=33	E n=32	p	S n=33	M n=19	p	M n=19	E n=32	p
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
pozitivno	24 (72,7)	23 (71,8)	-	24 (72,7)	12 (63,2)	-	12 (63,2)	23 (71,8)	-
negativno	9 (27,3)	9 (28,2)	>0,999	9 (27,3)	7 (36,8)	0,541	7 (36,8)	9 (28,2)	0,547
p-vrijednosti su izračunate Fisherovim egzaktnim testom *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001									

Dobiveni rezultati analize ekspresije proteina IL-6 korelirani su s obzirom na kliničko-patološke karakteristike tumora i oboljelih, odnosno stupanj diferencijacije tumora, stadij tumora po Dukes' -u, smještaj i veličinu tumora, te dob i spol oboljelih. Nije utvrđena statistički značajna razlika ekspresije proteina IL-6 u odnosu na kliničko-patološke karakteristike tumora u ispitivanim skupinama s obzirom na prisutnost i tip nestabilnosti.

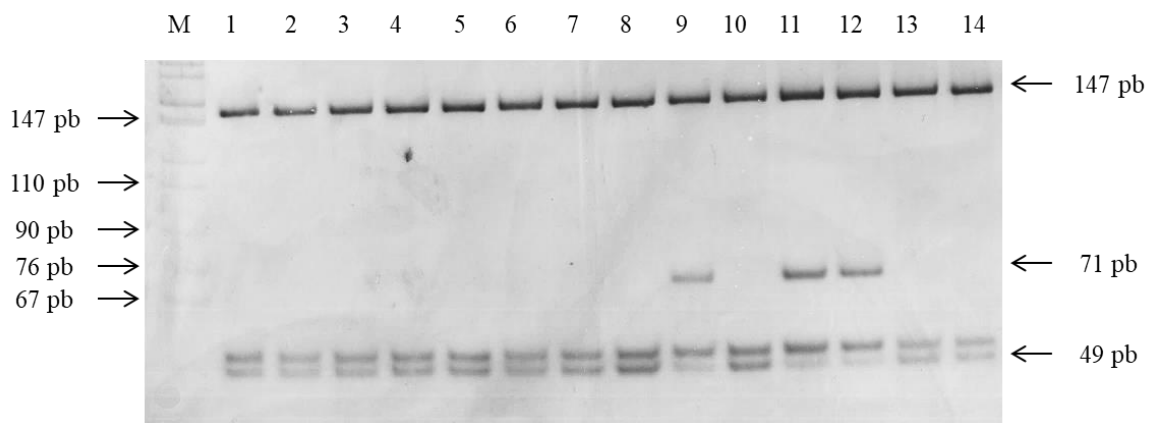
## 4.5. Analiza mutacija u genu *TP53*

Gen *TP53* jedan je od ključnih čimbenika u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva te ima značajnu ulogu u procesu metastaziranja te popravku oštećenja u molekuli DNA. U ovom istraživanju ispitali smo prisutnost najčešćih (*hotspot*) mutacija u kodonu 175, 248 i 273 ovog gena. Analiza mutacija u kodonu 175 i 248 provedena je metodom PCR-RFLP, dok je prisutnost mutacija u kodonu 273 analizirana metodom fluorescentne detekcije heterodupleksa (HRM).

### 4.5.1. Analiza mutacija u kodonu 175 gena *TP53*

Prisutnost mutacija u kodonu 175 eksona 5 (R175) gena *TP53* analizirana je metodom PCR-RFLP. Odsječak ciljne regije u kojoj se nalazi ovaj kodon umnožen je korištenjem para specifičnih oligonukleotidnih početnica, uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom produkta u 2,5 %-tnom gelu agaroze te je dobivena vrpca veličine 267 pb.

Dobiveni produkti reakcije PCR pocijepani su uz pomoć restrikcijskog enzima *CfoI* kako bi se utvrdila prisutnost mutacije. Odsječki dobiveni reakcijom RFLP razdvojeni su elektroforezom u 10 %-tnom gelu poliakrilamida. Kada u sekvenci gena nije prisutna mutacija R175 u produktu reakcije PCR prisutna su 3 restrikcijska mjesta za *CfoI* te se on u reakciji RFLP cijepa na odsječke veličine 18+49+53+147 pb. Kada je u sekvenci gena prisutna mutacija R175 tada se gubi jedno restrikcijsko mjesto za *CfoI* te se u reakciji RFLP produkt reakcije PCR pocijepa na odsječke veličine 49, 71 i 147 pb. (Slika 19).



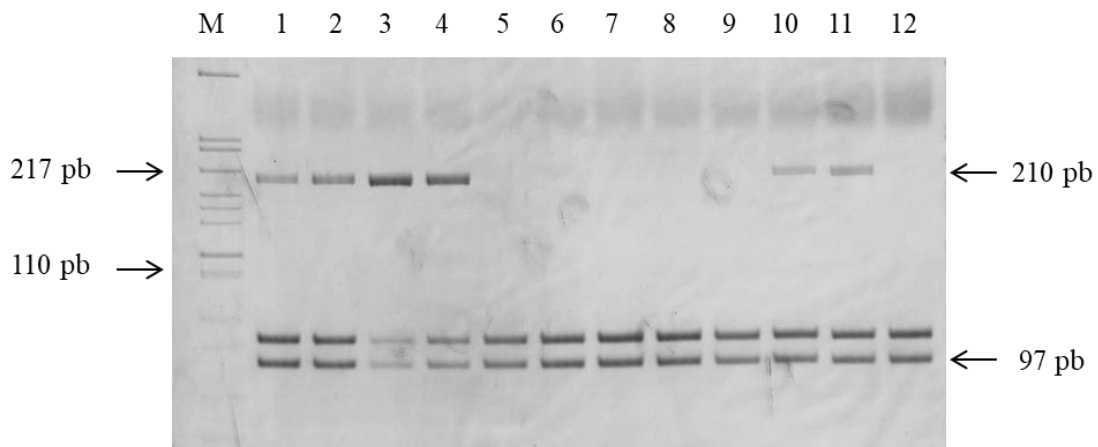
**Slika 19.** Analiza mutacija u kodonu 175 gena *TP53* u 10 %-tnom gelu poliakrilamida. M, DNA standard pBR322/*MspI* (New England, BioLabs, SAD); 1 - 8, 10, 13, 14 uzorci bez prisutnosti mutacije; 9, 11, 12 uzorci u kojima je prisutna mutacija R175.

Ukupno je analizirano 196 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Mutacija u kodonu 175 eksona 5 (R175) bila je prisutna u 14/196 (7,2 %) uzoraka. Kada se analizira prisutnost mutacija R175 obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti u skupini S je mutacija bila prisutna u 12/115 (10,4 %) uzoraka, u skupini E u 2/55 (3,6 %) uzoraka, dok u skupini M nije utvrđena prisutnost mutacije R175. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti ove mutacije između pojedinih skupina obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

#### 4.5.2. Analiza mutacija u kodonu 248 gena *TP53*

Prisutnost mutacija u kodonu 248 eksona 7 (R248) gena *TP53* analizirana je metodom PCR-RFLP. Odsječak ciljne regije u kojoj se nalazi ovaj kodon umnožen je korištenjem para specifičnih oligonukleotidnih početnica, uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom produkta u 2,5 %-tnom gelu agaroze te je dobivena je vrpca veličine 210 pb.

Dobiveni produkti reakcije PCR pocijepani su uz pomoć restrikcijskog enzima *MspI* kako bi se utvrdila prisutnost mutacije. Odsječci dobiveni reakcijom RFLP razdvojeni su elektroforezom u 10 %-tnom gelu poliakrilamida. Kada u sekvenci gena nije prisutna mutacija R248, u produktu reakcije PCR prisutno je restrikcijsko mjesto za *MspI* te se on u reakciji RFLP cijepa na odsječke veličine 97 i 113 pb. Kada je u sekvenci gena prisutna mutacija R248, tada se gubi restrikcijsko mjesto za *MspI* te u reakciji RFLP ne dolazi do cijepanja produkta reakcije PCR (produkt veličine 210 pb) (Slika 20).



**Slika 20.** Analiza mutacija u kodonu 248 gena *TP53* u 10 %-tnom gelu poliakrilamida. M, DNA standard pBR322/*MspI* (New England, BioLabs, SAD); 5-9, 12 uzorci bez prisutnosti mutacije; 1-4, 10, 11 uzorci u kojima je prisutna mutacija R248.

Ukupno je analizirano 196 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Mutacija u kodonu 248 eksona 7 (R248) je bila prisutna u 13/196 (6,6 %) uzoraka. Kada se analizira prisutnost mutacija R248 obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti u skupini S je mutacija bila prisutna u 8/115 (6,9 %) uzoraka, u skupini E u 4/55 (7,2 %) uzoraka, dok je u

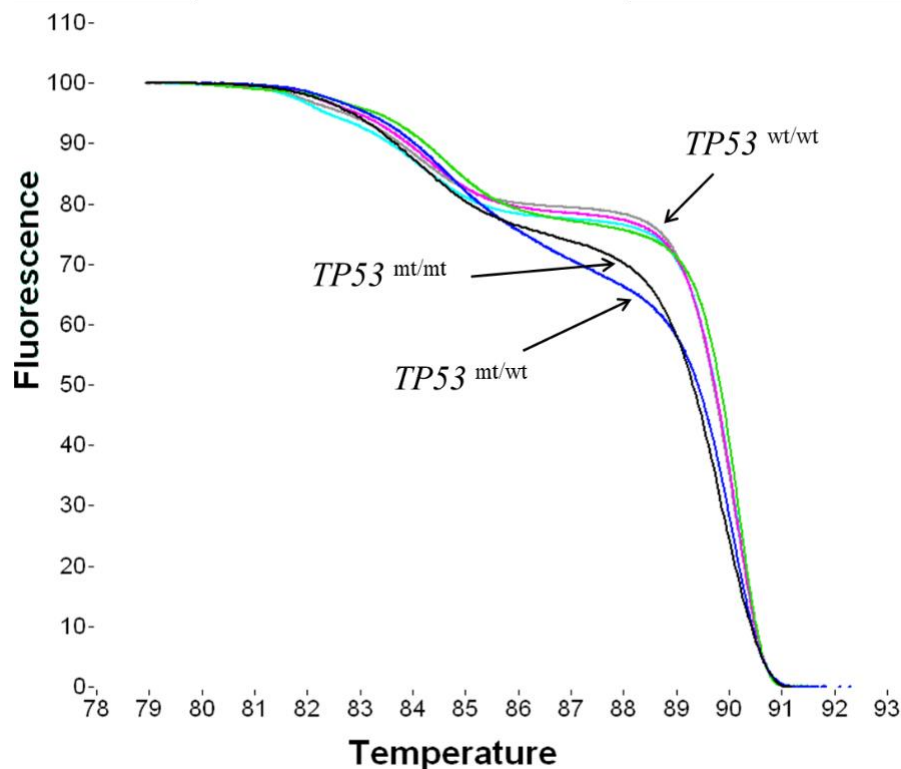
skupini M mutacija R175 bila opažena u 1/26 (3,8 %) uzorku. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti ove mutacije između pojedinih skupina obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

#### 4.5.3. Analiza mutacija u kodonu 273 gena *TP53*

Prisutnost mutacija u kodonu 273 eksona 8 (R273) gena *TP53* ispitana je metodom HRM.

Lančanom reakcijom polimeraze uz pomoć specifičnih oligonukleotidnih početnica u prisutnosti fluorescentne boje LC Green umnoženi su odsječci ciljne regije u eksonu 8 gena *TP53*, uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom produkta u 2,5 %-tnom gelu agaroze te je dobivena vrpca veličine 245 pb.

Dobiveni produkti reakcije PCR su najprije denaturirani, te zatim postupno renaturirani kako bi se potaknulo stvaranje heterodupleksa. Tako pripremljeni uzorci zatim su analizirani na instrumentu za analizu metodom fluorescentne detekcije heterodupleksa (HRM) (Slika 21).



**Slika 21.** Analiza mutacija u kodonu 273 gena *TP53* metodom fluorescentne detekcije heterodupleksa (HRM). (wt – uzorak divljeg tipa; mt – mutirani uzorak).

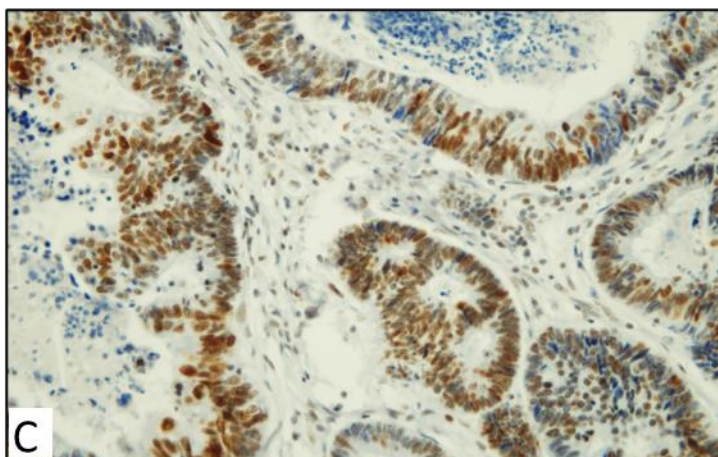
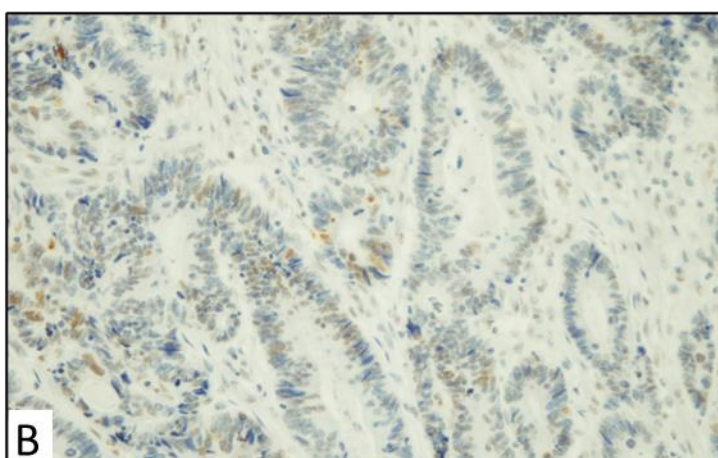
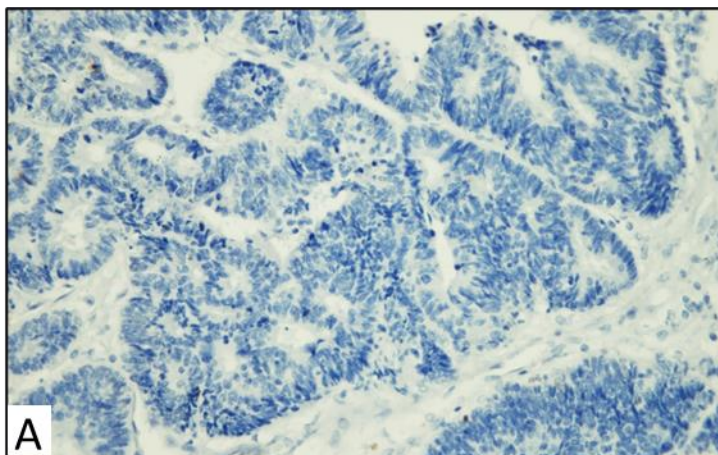
Ukupno je analizirano 196 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Mutacija u kodonu 273 eksona 8 (R273) bila je prisutna u 5/196 (2,6 %) uzoraka. Kada se analizira prisutnost mutacija R273 obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti u skupini S je mutacija bila prisutna u 4/115 (3,4 %) uzoraka, u skupini M mutacija R273 bila opažena u 1/26 (3,8 %) uzorku, dok u skupini E nije opažena ni jedna mutacija R273. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti ove mutacije između pojedinih skupina obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

#### **4.6. Analiza ekspresije proteina $\gamma$ H2A.X**

Fosforilirani histon H2A.X ( $\gamma$ H2A.X) je biljeg koji ukazuje na prisutnost dvolančanih lomova u molekuli DNA. Nestabilnost tipa EMAST povezana je s gubitkom funkcije proteina hMSH3 koji uz ulogu u popravku putem MMR također sudjeluje i u popravku dvolančanih lomova. Kako bismo ispitali prisutnost dvolančanih lomova obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti analizirali smo ekspresiju  $\gamma$ H2A.X imunohistokemijskom metodom u pojedinim skupinama (S, M i E). Imunohistokemijska analiza provedena je metodom peroksidaza-anti-peroksidaza uz korištenje specifičnih mišjih monoklonskih protutijela na protein  $\gamma$ H2A.X. Analiza ekspresije proteina  $\gamma$ H2A.X provedena je na uzorku od 84 oboljela od sporadičnog karcinoma debelog crijeva za koje su nam bili dostupni rezovi tumorskog tkiva uklopljeni u parafin.

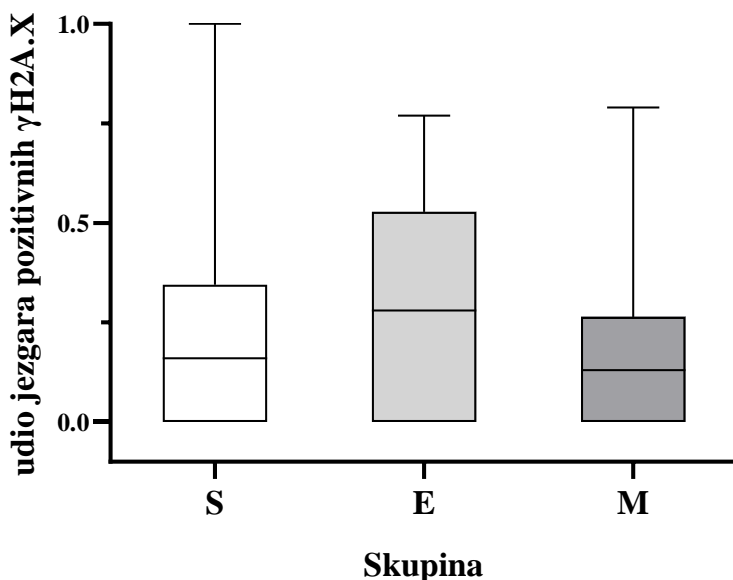
Analizom ekspresije proteina  $\gamma$ H2A.X u dijelu uzoraka uočena je pozitivna imunohistokemijska reakcija (smeđe obojenje) u jezgrama tumorskih stanica. U dijelu uzoraka nije uočeno smeđe obojenje jezgara te su oni smatrani negativnima na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X (Slika 22).

Udio jezgara pozitivnih na ekspresiju  $\gamma$ H2A.X u svakom uzorku određen je brojanjem jezgara negativnih i pozitivnih na  $\gamma$ H2A.X u 3 vidna polja. Ukupni zbroj pozitivnih jezgara iz svih vidnih polja u odnosu na ukupan broj jezgara predstavljao je udio pozitivnih jezgara za pojedini uzorak.



**Slika 22.** Ekspresija proteina  $\gamma$ H2A.X u sporadičnim tumorima debelog crijeva. A, jezgre tumorskih stanica negativne na protein  $\gamma$ H2A.X; B, manji udio jezgara tumorskih stanica pozitivnih na protein  $\gamma$ H2A.X; C, veći udio jezgara tumorskih stanica pozitivnih na protein  $\gamma$ H2A.X u parafinskim preparatima adenokarcinoma debelog crijeva (povećanje 400x).

Analiza ekspresije proteina  $\gamma$ H2A.X obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji ovog proteina između pojedinih skupina (Slika 23).



**Slika 23** Udio jezgara tumorskih stanica koje su bile pozitivne na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X u tkivu sporadičnih tumora debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti, p-vrijednosti su izračunate nezavisnim t-testom \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

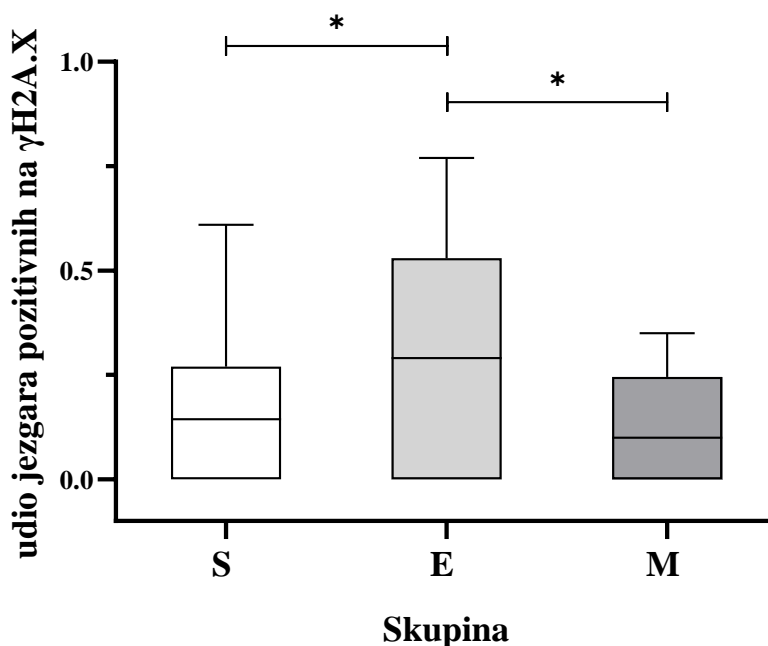
#### **4.7. Analiza ekspresije proteina $\gamma$ H2A.X u odnosu na prisutnost mutacija u genu *TP53***

Fosforilirani oblik proteina H2A.X,  $\gamma$ H2A.X jedan je od prvih proteina koji se akumulira na mjestima dvolančanih lomova DNA te aktivira prijenos signala putem proteina TP53, nakon čega dolazi do popravka DNA, senescencije ili apoptoze. Stoga je u ovom istraživanju ispitan odnos između ekspresije  $\gamma$ H2A.X i mutacija gena *TP53* obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.



Ova analiza provedena je na uzorku od 84 oboljela od sporadičnog karcinoma debelog crijeva za koje su nam bili dostupni rezovi tumorskog tkiva uklopljeni u parafin. Analizom je obuhvaćeno 68 uzoraka divljeg tipa gena *TP53*, te 16 uzoraka s mutacijom u genu *TP53* (R175, R248 ili R273).

Kada su iz daljnje analize isključeni uzorci u kojima je dokazana prisutnost najčešćih mutacija gena *TP53*, preostali uzorci analizirani su obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti te je dobivena statistički značajna razlika u udjelu jezgara tumorskih stanica pozitivnih na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X između skupina S i E ( $p=0,046$ ) te između skupina E i M ( $p=0,012$ ). U oba slučaja je u skupini E udio jezgara tumorskih stanica pozitivnih na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X bio značajno viši (medijan 0,3) i u odnosu na skupinu S (medijan 0,17) kao i u odnosu na skupinu M (medijan 0,12). Nije opažena statistički značajna razlika u udjelu jezgara tumorskih stanica pozitivnih na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X između skupina S i M (Slika 24).



**Slika 24.** Udio jezgara tumorskih stanica pozitivnih na  $\gamma$ H2A.X obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti u tumorima u kojima nije prisutna mutacija gena *TP53*. p-vrijednosti su izračunate nezavisnim t-testom \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

## 5. RASPRAVA

Tumorigeneza je stupnjeviti proces u kojem dolazi do akumulacije mutacija koje tumorskoj stanici omogućuju da zaobiđe obrambene mehanizme organizma te joj ujedno daju i selektivnu prednost u procesu evolucije tumora. Stupnjevitost tumorigeneze po prvi je put sustavno opisana na modelu nastanka i napredovanja tumora debelog crijeva tzv. sekvenci adenom-karcinom [12]. Istraživanjem molekularnih mehanizama koji doprinose nastanku i napredovanju drugih tipova tumora s vremenom je uočeno kako tumorske stanice neovisno o primarnom sijelu tumora moraju steći osobine koje su zajedničke svim solidnim tumorima: autonomiju u signalima rasta, neograničenu sposobnost proliferacije i replikacije, izbjegavanje supresora rasta, izbjegavanje imunološkog odgovora i programirane stanične smrti, reprogramiranje metabolizma stanice, stvaranje novih krvnih žila (neoangiogeneza) te stjecanje osobina vezanih uz metastaziranje. Iako su prvotno smatrani modificirajućim čimbenicima tumorigeneze, nestabilnost genoma i kronična upala danas se također ubrajaju u ključna obilježja tumora. U kontekstu karcinoma debelog crijeva mehanizam koji značajno ubrzava proces tumorigeneze je mikrosatelitna nestabilnost gdje zbog gubitka funkcije sustava MMR dolazi do nakupljanja velikog broja mutacija u relativno kratkom vremenu. Naime, uslijed ovakvog brzog nakupljanja mutacija skraćuje se vremenski period za prelazak adenoma u karcinom s uobičajenih jednog do dva desetljeća na samo jednu do dvije godine [33,115]. Geni *MLH1*, *MSH2* i *PMS2* sustava MMR primarno su odgovorni za nastanak nestabilnosti tipa MSI koju karakteriziraju promjene na mono- i više nukleotidnim mikrosatelitnim ponavljanjima [81]. Kronična upala odnosno njen medijator IL-6 povezuje se s pojavom nestabilnosti tipa EMAS [27,50].

Ovim se istraživanjem nastojala ispitati uloga nestabilnosti tipa EMAS u tumorigenezi sporadičnih karcinoma debelog crijeva bilo samostalno ili udruženo s nestabilnosti tipa MSI. Ova nestabilnost povezuje se s gubitkom funkcije proteina hMSH3 koji, uz popravak molekule DNA putem sustava MMR, također sudjeluje i u popravku dvolančanih lomova.

U skladu s navedenim naš uzorak smo obzirom na prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti podijelili na tumore u kojima nije bila prisutna mikrosatelitna nestabilnost (skupina S) te tumore u kojima je utvrđena mikrosatelitna nestabilnost. Zatim smo tumore u kojima je utvrđena mikrosatelitna nestabilnost dalje podijelili u skupine na način da što je moguće bolje diferenciramo pojavu nestabilnosti tipa EMAS<sup>T</sup>, samostalno ili povezane s promjenama na dinukleotidnim biljezima koje bi mogle biti rezultat translokacije proteina hMSH3 iz jezgre u citoplazmu (skupina E), te nestabilnosti tipa EMAS<sup>T</sup> koja se javlja u širem kontekstu nestabilnosti tipa MSI (skupina M), gdje nestabilnost tipa EMAS<sup>T</sup> nastaje uslijed gubitka funkcije ostalih proteina sustava MMR [33,55].

Mehanizam gubitka funkcije proteina hMSH3 je jedinstven među proteinima sustava MMR jer gotovo nikad nije posljedica primarne mutacije ni epigenetskog utišavanja [21,50]. Malobrojne mutacije koje se detektiraju u ovom genu nastaju sekundarno uglavnom zbog epigenetskog utišavanja gena *MLH1* u sporadičnim karcinomima debelog crijeva, dok nasljedne mutacije gena *MSH3* sve donedavno nisu bile opisane, te se smatraju rijetkim događajem [50]. Na staničnim linijama karcinoma debelog crijeva pokazano je da prisutnost pro-upalnog citokina IL-6 dovodi do premještanja proteina hMSH3 iz jezgre, gdje sudjeluje u popravku putem sustava MMR, u citoplazmu, što nije opaženo kod preostalih proteina ovog sustava [59,61]. To dovodi do nakupljanja mikrosatelitne nestabilnosti na di- i tetranukleotidnim ponavljanjima te drugih oštećenja molekule DNA [22].

U literaturi je opisana polimorfna repetitivna sekvenca od 9 pb u eksonu 1 gena *MSH3* za koju je prema preliminarnim studijama *in vitro* pokazano da u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva ima sterički utjecaj na dostupnost signala za smještaj hMSH3 u jezgri. Konkretno, u staničnim linijama tumora debelog crijeva u kojima je prisutna sekvenca s delecijom 3 ponavljanja (alel  $\Delta$ ), dolazi do premještanja proteina hMSH3 iz jezgre u citoplazmu kada su stanice izložene IL-6 i/ili oksidativnom stresu. Nasuprot tome, u stanicama u kojima je prisutan alel FL do premještanja dolazi samo uslijed izloženosti IL-6. Daljnjim istraživanjem je utvrđeno da promjena konformacije proteina koji je kodiran alelom  $\Delta$  dovodi do otežanog vraćanja proteina hMSH3 u jezgru. Ovi nalazi ukazuju na to da bi alel  $\Delta$  mogao imati potencijal za akumulaciju proteina hMSH3 u citoplazmi [61,62].

U našem istraživanju nije dokazana razlika u raspodjeli genotipova polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* između pojedinih skupina s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. No, u dijelu uzoraka opažena je promjena u genotipu polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* u tkivu tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu, što se manifestiralo kao gubitak nekog od alela u 27,4 % informativnih uzoraka pri čemu je u najčešća promjena bio gubitak alela  $\Delta$ .

Može se reći kako genotip koji je prisutan u tkivu normalne sluznice predstavlja zapravo inicijalne fiziološke postavke pojedinca. Nasuprot tome, promjene koje tumor stječe tijekom svog nastanka i napredovanja daju tumorskim stanicama komparativnu prednost u odnosu na ostale stanice. Stoga opaženi preferencijalni gubitak alela  $\Delta$  ukazuje na stečenu promjenu koja bi mogla doprinijeti evoluciji samog tumora. Tseng-Rogenski i sur. (2020) su pokazali da stanice u kojima je prisutan alel  $\Delta$  pokazuju veću sklonost za akumulaciju proteina hMSH3 u citoplazmi i osjetljivije su na oksidativni stres. U alelu  $\Delta$  gena *MSH3* slijed NLS1, kojega prepoznaje importin čime je omogućen unos proteina u jezgru kroz kompleks jezgrene pore, smješten je na manje dostupnu lokaciju. Stoga je povratak hMSH3 u jezgru gdje ovaj protein vrši svoju funkciju u popravku DNA otežan. U spomenutoj studiji također je na modelu *in vitro* pokazano da stanice koje su nosioci alela  $\Delta$  u uvjetima koji simuliraju oksidativni stres premještaju protein hMSH3 u citoplazmu [61]. Stoga bi preferencijalni gubitak alela  $\Delta$  potencijalno mogao predstavljati adaptivni mehanizam tumorskih stanica na uvjete oksidativnog stresa u kojima je povećana potreba za popravkom DNA te u tom kontekstu i povratkom proteina hMSH3 u jezgru [61,116].

Prema podacima iz literature polimorfizam +3133A/G u eksonu 24 gena *MSH3* povezuje se s povećanim rizikom za razvoj različitih tipova tumora. Konkretno, alel A polimorfizma *MSH3* +3133A/G povezan je s povećanim rizikom obolijevanja od karcinoma debelog crijeva, dojke, mokraćnog mjehura i jajnika [113,117]. Također, ovaj polimorfizam povezuje se i sa sklonošću obolijevanja od neuroloških oboljenja u kojima ekspanzija mikrosatelitnih ponavljanja CAG·CTG ima značajnu ulogu. Kod oboljelih od miotonične distrofije tipa 1, pokazano je da homozigotni nosioci genotipa AA pokazuju snažniju ekspanziju ponavljanja CAG·CTG što su autori povezali s učinkovitijim popravkom krivo sparenih baza te progresijom bolesti [69].

Funkcionalni polimorfizam koji se nalazi u sekvenci koja kodira ATP-aznu domenu proteina hMSH3. Aktivnost ATP-azne domene esencijalna je za provjeru i potvrdu nepravilno sparenih baza prije inicijacije popravka DNA [70–72]. Iako bi se moglo pretpostaviti da ovaj polimorfizam može utjecati na učinkovitost proteina hMSH3 u popravku DNA, u našem istraživanju nije dokazana razlika u učestalosti genotipova polimorfizma *MSH3* +3133A/G između pojedinih skupina s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

Kako bismo ispitali ekspresiju proteina hMSH3 u tkivu tumora oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva koristili smo imunohistokemijsku metodu te smo dobivene rezultate analizirali s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. U našem uzorku dokazan je povećani udio jezgara negativnih na ekspresiju proteina hMSH3 u skupini E u odnosu na skupinu S ( $p=0,0007$ ; medijan 0,56). Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Haugen i sur. (2008) koji su pokazali da je povećani udio jezgara negativnih na ekspresiju proteina hMSH3 bio prisutan u skupini EMAST, koju su oni definirali kao MSI-L(dinukleotidi)/EMAST i MSS/EMAST, u odnosu na skupinu non-EMAST tumora koju su definirali kao MSS/non-EMAST [28]. Nadalje u našem istraživanju smo također dokazali veći udio jezgara negativnih na ekspresiju proteina hMSH3 u skupini M u odnosu na skupinu S ( $p=0,008$ ). Između skupina M i E nije utvrđena značajna razlika s obzirom na udio jezgara negativnih na ekspresiju proteina hMSH3. Ovaj nalaz ukazuje da se s obzirom na prisutnost proteina hMSH3 u jezgri ove dvije skupine ne mogu razlikovati.

Kronična upala povezana je s nastankom i napredovanjem niza zloćudnih oboljenja uključujući i karcinom debelog crijeva [118]. Jedan od glavnih medijatora kronične upale je interleukin-6 čija ekspresija može biti povišena u mikrookolišu tumora [86]. Visoke razine IL-6 u serumu povezane su s povećanim rizikom od razvoja karcinoma debelog crijeva [119,120]. Istraživanja su također pokazala da IL-6 potiče rast epitelnih stanica karcinoma debelog crijeva u uvjetima *in vitro* [121]. Također na modelu stanica karcinoma kolona *in vitro* opisana je uloga IL-6 u premještanju proteina hMSH3 iz jezgre u citoplazmu, no molekularni mehanizmi koji su u podlozi ovih procesa nisu do kraja razjašnjeni [59,61].

Prema literaturi prijenos signala putem trans signalnog puta interleukina-6 predstavlja važan čimbenik u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva. Interleukin-6 preko aktivacije transkripcijskog faktora STAT3 izravno potiče transkripciju gena uključenih u proliferaciju (*ciklin D1*) i preživljenje (*BCL-2*) tumorskih stanica [99]. STAT3 također potiče transkripciju interleukina-6 čime se uspostavlja mehanizam povratne sprege u kojem IL-6 potiče vlastitu sintezu [122]. Holmer i sur. su dokazali da pojedine stanične linije karcinoma debelog crijeva ekspimiraju IL-6 (SW480, Caco-2) dok u staničnoj liniji HT-29 nije dokazana ekspresija ovog citokina. Nadalje, u svim prethodno navedenim staničnim linijama je detektirana prisutnost mRNA transkripata za IL-6R i gp130. Iako je koreceptor gp130 prisutan na membranama staničnih linija karcinoma debelog crijeva, sama prisutnost receptora IL-6R na membranama stanica svih staničnih linija karcinoma debelog crijeva nije potvrđena [90]. Naime, Tseng-Rogenski i sur. (2015) su dokazali prisutnost transmembranskog IL-6R u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva SW480 i SW620, dok u staničnoj liniji karcinoma debelog crijeva HT29 nije dokazana prisutnost ovog receptora na membrani stanica [59]. Predloženo objašnjenje ovog fenomena je potencijalno niska razina ekspresije *IL-6R* mRNA ili brzo proteolitičko cijepanje receptora za IL-6 na samoj membrani putem proteaze ADAM17 [90]. Proteolitičkim cijepanjem izvanstanične domene transmembranskog IL-6R nastaje topivi oblik receptora za IL-6 (sIL-6R) [94] koji također u znatno manjoj mjeri može nastati i alternativnim prekrajanjem *IL-6R* mRNA [95]. Navedena opažanja ukazuju na to da je neto učinak signalne kaskade aktivirane djelovanjem citokina IL-6 određen prisutnošću i količinom IL-6, ali također i prisutnošću i količinom njegovog receptora IL-6R i koreceptora gp130 te njihovih solubilnih oblika sIL-6R, i sgp130.

Na razinu ekspresije citokina IL-6 utječe prisutnost funkcionalnih polimorfizama u genu *IL-6*. Jedan od najčešće opisanih polimorfizama koji utječe na ekspresiju ovog citokina je *IL-6* -174G/C, smješten u promotoru gena *IL-6* [123]. Jones i sur. povezali su povišene razine IL-6 u plazmi ispitanika s alelom C te genotipom CC ovog polimorfizma [103].

U našem istraživanju smo po prvi puta ispitali učestalost polimorfizma *IL-6* -174G/C u pojedinim skupinama oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. Prema našim rezultatima opažen je trend u raspodjeli pojedinih

genotipova između skupine S i E pri čemu su nosioci genotipa CC bili učestaliji u skupini E ( $p=0,051$ ). Prema prije navedenom, genotip CC polimorfizma *IL-6* -174G/C povezuje se s višim razinama IL-6 u serumu u odnosu na nosioce genotipa GG [103]. Sukladno tome nosioci genotipa CC koji su u našem istraživanju bili učestaliji u skupini E potencijalno fiziološki imaju povišene razine IL-6 u odnosu na skupinu S. Novija istraživanja ukazuju na povezanost nestabilnosti tipa EMASST, koja je karakteristika skupine E, s kroničnom upalom odnosno s IL-6 [21,59,61]. Stoga su ovi naši rezultati u skladu s predloženom ulogom IL-6 u etiologiji nestabilnosti tipa EMASST.

U literaturi je pokazano kako povećana razina topivog oblika receptora IL-6 dovodi do smanjenog klasičnog prijenosa signala putem transmembranskog receptora IL-6 odnosno povećanog trans prijenosa signala. [59]. Funkcionalni polimorfizam *IL-6R* +48892 A/C koji se nalazi u kodirajućoj sekvenci receptora za interleukin-6 povezan je s dvostruko većom razinom topivog oblika sIL-6R u serumu [107]. Navedeni polimorfizam se nalazi u blizini mjesta koje cijepa proteaza ADAM17 te stoga dolazi do povećanja u količini sIL-6R u serumu [108]. U našem istraživanju nije dokazana razlika u učestalosti genotipova polimorfizma *IL-6R* +48892A/C u pojedinim skupinama oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti.

Poznato je iz literature da je topivi oblik koreceptora proteina interleukin-6 (sgp130) prirodni inhibitor trans signalnog puta. Topivi gp130 (sgp130) sprječava vezanje kompleksa IL-6/sIL-6R na gp130 koji se nalazi na površini stanice [100,124]. Wonnereth i sur. su prvi istražili utjecaj polimorfizma *gp130* +148G/C na razinu sgp130 u serumu zdravih ispitanika te pokazali da nosioci alela C imaju više razine topivog oblika gp130 te time prirodno smanjene razine aktivacije trans signalnog puta [110]. Također je na životinjskom modelu pokazano kako je korištenjem fuzijskog proteina sgp130-Fc moguće suprimirati upalne procese u crijevu budući da se tako blokira trans signalni put IL-6 [125,126]. Tseng-Rogenski i sur. (2015) su na modelu stanica karcinoma debelog crijeva također pokazali da dodatak ovog fuzijskog proteina sprječava premještanje hMSH3 iz jezgre u citoplazmu uslijed tretmana IL-6 [59].

U našem istraživanju po prvi puta je analizirana učestalost polimorfizma *gp130* +148G/C u pojedinim skupinama oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva, uzimajući u obzir tip i vrstu mikrosatelitne nestabilnosti. Učestalost nosioca alela C (genotip GC+CC) bila je značajno niža u skupini E u odnosu na skupinu stabilnih tumora S ( $p=0,037$ ). Također, učestalost alela C je bila značajno niža u skupini E u odnosu na skupinu S ( $p=0,031$ ). Dakle, u skupini E u našem istraživanju bili su manje učestali nosioci alela C, koji imaju prirodno povišene razine *sgp130*, u odnosu na skupinu S. Potencijalno, u skupini E, gdje nisu prisutne povišene razine *sgp130*, dolazi do stvaranja povoljnih uvjeta za prijenos signala trans signalnim putem IL-6. S druge pak strane, potencijalno povišene razine *sgp130* u skupini S mogle bi puferirati IL-6, te time dovesti do smanjene aktivacije trans signalnog puta. Pretpostavlja se da je upravo prijenos signala trans signalnim putem ključan oblik signalizacije IL-6 u stimulaciji gotovo svih stanica u tijelu, uključujući i epitelne stanice crijeva te također i tumorske stanice. Stoga *sgp130* potencijalno predstavlja ključnu barijeru koja štiti stanicu od potencijalno negativnog učinka IL-6 [88,97,99].

U našem smo istraživanju ispitali ekspresiju proteina IL-6 obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. Ekspresija proteina IL-6 bila je dokazana u citoplazmi stanica tumora debelog crijeva te je u 59/84 (70,2 %) uzoraka bila prisutna pozitivna imunohistokemijska reakcija na IL-6. Nije dokazana razlika u ekspresiji ovog proteina s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti između pojedinih skupina oboljelih. Ovaj rezultat razlikuje se od rezultata koje su dobili Tseng-Rogenski i sur. (2015). U njihovom istraživanju, u tumorima debelog crijeva pozitivnim na nestabilnost tipa EMAS<sup>T</sup> utvrđena je viša razina ekspresije IL-6 u usporedbi s tumorima negativnim na ovaj tip nestabilnosti, no njihova analiza je provedena na manjem broju uzoraka [59].

Protein hMSH3 u literaturi je prvotno opisan u kontekstu popravka MMR, međutim novija istraživanja ukazuju na značajnu ulogu ovog proteina u popravku dvolančanih lomova molekule DNA [21]. Van Oers i sur. (2014) su u istraživanju *in vivo*, na transgeničnim miševima kojima je dokinuta funkcija gena *MSH3*, pokazali da nakon primjene ionizirajućeg zračenja, uz pojavu umjerene razine mikrosatelitne nestabilnosti, također dolazi i do nepravilnog popravaka dvolančanih lomova DNA. To se manifestira nakupljanjem fosforiliranog oblika histona H2A.X



( $\gamma$ H2A.X), biljega koji se koristi kao indikator prisutnosti ovog tipa genomske nestabilnosti [73]. Konkretno, protein  $\gamma$ H2A.X se akumulira na mjestima dvolančanih lomova DNA te aktivira prijenos signala putem p53 [127].

Stoga smo u ovom istraživanju odlučili ispitati prisutnost fosforiliranog oblika histona  $\gamma$ H2A.X u tkivu tumora oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. U našem uzorku nije bilo značajne razlike između pojedinih analiziranih skupina obzirom na udio jezgara tumorskih stanica pozitivnih na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X. Međutim, u popravku dvolančanih lomova sudjeluje i protein p53, te njegova inaktivacija uslijed mutacija ima značajan učinak na ovaj popravak [128]. Stoga, kada su iz daljnje analize isključeni uzorci u kojima je dokazana prisutnost najčešćih mutacija gena *TP53*, u preostalim uzorcima je dokazana statistički značajna razlika u udjelu jezgara tumorskih stanica pozitivnih na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. Dokazan je viši udio jezgara tumorskih stanica pozitivnih na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X u skupini E i u odnosu na skupinu S ( $p=0,046$ ) kao i u odnosu na skupinu M ( $p=0,012$ ). Dakle, nepopravljeni dvolančani lomovi koji su dokazani akumulacijom  $\gamma$ H2A.X su učestaliji u skupini E kada su analizirani uzorci u kojima nisu dokazane najčešće mutacije gena *TP53* (kodon 175, 248 i 273). Dugo se smatralo da mikrosatelitna i kromosomska nestabilnost ne mogu koegzistirati u istoj stanici zbog različitih putova kojima nastaju. Međutim, studije u kojima je korišten NGS (od engl. *next generation sequencing*) pokazale su da postoji skupina tumora s mikrosatelitnom nestabilnošću, MSS/EMAST, u kojima ove promjene koegzistiraju [129]. Stoga su naši rezultati u skladu s prije navedenim budući da je i našem istraživanju u uzorcima u kojima je prisutna nestabilnost tipa EMAST uočen i deficit u popravku dvolančanih lomova. Ovakav deficit nije uočen u tumorima gdje je dominantna nestabilnost tipa MSI. Poznato je iz literature da tumori, u kojima je dominantno obilježje nestabilnost tipa MSI popravljaju dvolančane lomove putem popravka MMEJ (od engl. *microhomology-mediated end joining*), što je i temelj ideje o međusobno isključivim MSI i CIN [130].

Zaključno možemo reći da naši rezultati ukazuju da se, obzirom na odsutnost proteina hMSH3 u jezgri skupina E i skupina M ne razlikuju. Međutim, kada se rezultati analiziraju u odnosu na stabilne uzorke (skupina S), tada je i u skupini E i u skupini M udio jezgara negativnih

na ekspresiju proteina hMSH3 značajno viši u odnosu na skupinu S. Analizom raspodjele genotipova funkcionalnih polimorfizama gena *MSH3* (polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* i *MSH3* +3133A/G) nije dokazana razlika između pojedinih skupina obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. Rezultati dobiveni analizom polimorfizma *IL-6* -174G/C ukazuju da je genotip CC učestaliji u skupini E u odnosu na skupinu S. Obzirom na genotip polimorfizma *gp130* +148G/C nosioci alela C su bili značajno manje zastupljeni u skupini E u odnosu na skupinu S. U našem istraživanju također nije utvrđena razlika u ekspresiji proteina IL-6 između analiziranih skupina s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. U tumorima u kojima nisu dokazane *hotspot* mutacije gena *TP53* veći udio jezgara tumorskih stanica bio je pozitivan na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X u skupini E u odnosu na skupine S i M.

## 6. ZAKLJUČCI

- Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova funkcionalnih polimorfizama gena *MSH3* (polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* i *MSH3* +3133A/G) s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti između pojedinih skupina oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva (S, M i E). U našem uzorku uočene su razlike u genotipu polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* u tkivu tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu u vidu gubitka nekog od alela u 27,4 % informativnih uzoraka pri čemu je najčešća promjena u tumorima bio je gubitak alela  $\Delta$ .
- Opažena je statistički značajna razlika u ekspresiji proteina hMSH3 s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti između pojedinih skupina oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva (S, M i E). U skupini E opažen je veći udio jezgara negativnih na ovaj protein u odnosu na skupinu S ( $p=0,0007$ ). Također je opažen veći udio jezgara negativnih na ekspresiju proteina hMSH3 u skupini M u odnosu na skupinu S ( $p=0,008$ ). Između skupina M i E nije dokazana značajna razlika u udjelu jezgara negativnih na ekspresiju proteina hMSH3.
- Opažen je trend u raspodjeli pojedinih genotipova polimorfizma *IL-6* -174G/C s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti između skupine S i E ( $p=0,051$ ) oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Nosioци genotipa CC bili su učestaliji u skupini E u odnosu na skupinu S.
- Nije utvrđena značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova polimorfizama *IL-6R* +48892A/C s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti između pojedinih skupina oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva (S, M i E).
- Opažena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova polimorfizma *gp130* +148G/C s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti između skupine S i E ( $p=0,037$ ). Nosioци alela C (genotip GC+CC) su bili značajno manje učestali u skupini E u odnosu na skupinu S. Također, na razini alela, opažena je značajno manja učestalost alela C u skupini E u odnosu na skupinu S ( $p=0,031$ ).

- Nije utvrđena značajna razlika u ekspresiji proteina IL-6 u odnosu na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti između pojedinih skupina oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva (S, M i E).
- Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji proteina  $\gamma$ H2A.X s obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti između pojedinih skupina oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva (S, M i E). Kada su analizirani uzorci stratificirani obzirom na prisutnost najčešćih *hotspot* mutacija gena *TP53*, u uzorcima u kojima nisu dokazane ove mutacije, utvrđena je značajna razlika u udjelu jezgara tumorskih stanica pozitivnih na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X. Udio jezgara tumorskih stanica pozitivnih na ekspresiju proteina  $\gamma$ H2A.X bio je značajno viši u skupini E u odnosu na skupine S ( $p= 0,044$ ) i M ( $p=0,012$ ).

## 7. LITERATURA

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021, *71*, 209–249.
2. Pietras, K.; Östman, A. Hallmarks of Cancer: Interactions with the Tumor Stroma. *Exp Cell Res* 2010, *316*, 1324–1331.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000, *100*, 57–70.
4. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 2011, *144*, 646–674.
5. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 2010, *140*, 883–899.
6. Dienstmann, R.; Vermeulen, L.; Guinney, J.; Kopetz, S.; Tejpar, S.; Tabernero, J. Consensus Molecular Subtypes and the Evolution of Precision Medicine in Colorectal Cancer. *Nat Rev Cancer* 2017, *17*, 79–92.
7. Mármol, I.; Sánchez-de-Diego, C.; Dieste, A.P.; Cerrada, E.; Yoldi, M.J.R. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2017, *18*.
8. Fearon, E.R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2011, *6*, 479–507.
9. Kumari, S.; Sharma, S.; Advani, D.; Khosla, A.; Kumar, P.; Ambasta, R.K. Unboxing the Molecular Modalities of Mutagens in Cancer. *Environmental Science and Pollution Research* 2022, *29*, 62111–62159.
10. Raeker, M.O.; Carethers, J.M. Immunological Features with DNA Microsatellite Alterations in Patients with Colorectal Cancer. *J Cancer Immunol* 2020, *2*, 116–127.
11. Brenner, H.; Kloor, M.; Pox, C.P. Colorectal Cancer. *The Lancet* 2014, *383*, 1490–1502.

12. Fearon, E.F.; Vogelstein, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 1990, *61*, 759–767.
13. Keum, N.N.; Giovannucci, E. Global Burden of Colorectal Cancer: Emerging Trends, Risk Factors and Prevention Strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019, *16*, 713–732.
14. Al-Sohaily, S.; Biankin, A.; Leong, R.; Kohonen-Corish, M.; Warusavitarne, J. Molecular Pathways in Colorectal Cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2012, *27*, 1423–1431.
15. Zhu, G.; Pei, L.; Xia, H.; Tang, Q.; Bi, F. Role of Oncogenic KRAS in the Prognosis, Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer. *Mol Cancer* 2021, *20*.
16. Li, J.; Ma, X.; Chakravarti, D.; Shalpour, S.; Depinho, R.A. Genetic and Biological Hallmarks of Colorectal Cancer. *Genes Dev* 2021, *35*, 787-820.
17. Farooqi, A.A.; de la Roche, M.; Djamgoz, M.B.A.; Siddik, Z.H. Overview of the Oncogenic Signaling Pathways in Colorectal Cancer: Mechanistic Insights. *Semin Cancer Biol* 2019, *58*, 65–79.
18. Harada, S.; Morlote, D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol* 2020, *27*, 20-26.
19. Schöniger, S.; Rüschoff, J. Mismatch Repair Deficiency and Microsatellite Instability. *Encyclopedia* 2022, *2*, 1559–1576.
20. Ellegren, H. Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. *Nat Rev Genet* 2004, *5*, 435–445.
21. Koi, M.; Tseng-Rogensk, S.S.; Carethers, J.M. Inflammation-Associated Microsatellite Alterations: Mechanisms and Significance in the Prognosis of Patients with Colorectal Cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2018, *10*, 1–14.
22. Carethers, J.M. Hereditary, Sporadic and Metastatic Colorectal Cancer Are Commonly Driven by Specific Spectrums of Defective DNA Mismatch Repair Components. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2016, *127*, 81–97.

23. Li, G.M. Mechanisms and Functions of DNA Mismatch Repair. *Cell Res* 2008, 18, 85–98.
24. Li, S.K.H.; Martin, A. Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends Mol Med* 2016, 22, 274–289.
25. Amato, M.; Franco, R.; Facchini, G.; Addeo, R.; Ciardiello, F.; Berretta, M.; Vita, G.; Sgambato, A.; Pignata, S.; Caraglia, M.; Accardo M.; Zito Marino F. Microsatellite Instability: From the Implementation of the Detection to a Prognostic and Predictive Role in Cancers. *Int J Mol Sci* 2022, 23.
26. Boland, C.R.; Thibodeau, S.N.; Hamilton, S.R.; Sidransky, D.; Eshleman, J.R.; Burt, R.W.; Meltzer, S.J.; Rodriguez-Bigas, M.A.; Fodde, R.; Ranzani, G.N.; Srivastava S. A . A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 1998, 58, 5248–5257.
27. Devaraj, B.; Lee, A.; Cabrera, B.L.; Miyai, K.; Luo, L.; Ramamoorthy, S.; Keku, T.; Sandler, R.S.; McGuire, K.L.; Carethers, J.M. Relationship of EMAST and Microsatellite Instability Among Patients with Rectal Cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2010.
28. Haugen, A.C.; Goel, A.; Yamada, K.; Marra, G.; Nguyen, T.P.; Nagasaka, T.; Kanazawa, S.; Koike, J.; Kikuchi, Y.; Zhong, X.; Arita M.; Shibuya K.; Oshimura M.; Hemmi H.; Boland C.R.; Koi M. Genetic Instability Caused by Loss of MutS Homologue 3 in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res* 2008, 68, 8465–8472.
29. Adam, R.; Spier, I.; Zhao, B.; Kloth, M.; Marquez, J.; Hinrichsen, I.; Kirfel, J.; Tafazzoli, A.; Horpaopan, S.; Uhlhaas, S.; Stienen D.; Friedrichs N.; Altmüller J.; Laner A.; Holzapfel S.; Peters S.; Kayser K.; Thiele H.; Holinski-Feder E.; Marra G.; Kristiansen G.; Nöthen M.M.; Büttner R.; Möslein G.; Betz R.C.; Brieger A.; Lifton R.P.; Aretz S. Exome Sequencing Identifies Biallelic MSH3 Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *Am J Hum Genet* 2016, 99, 337–351.
30. Campregher, C.; Schmid, G.; Ferk, F.; Knasmüller, S.; Khare, V.; Kortüm, B.; Dammann, K.; Lang, M.; Scharl, T.; Spittler, A.; Roig A.I.; Shay J.W.; Gerner C.; Gasche C. MSH3-

- Deficiency Initiates EMMST without Oncogenic Transformation of Human Colon Epithelial Cells. *PLoS One* 2012, 7.
31. Huang, S.C.; Lee, J.K.; Smith, E.J.; Doctolero, R.T.; Tajima, A.; Beck, S.E.; Weidner, N.; Carethers, J.M. Evidence for an HMMH3 Defect in Familial Hamartomatous Polyps. *Cancer* 2011, 117, 492–500.
  32. Tseng-Rogenski, S.S.; Chung, H.; Wilk, M.B.; Zhang, S.; Iwaizumi, M.; Carethers, J.M. Oxidative Stress Induces Nuclear-to-Cytosol Shift of HMMH3, a Potential Mechanism for EMMST in Colorectal Cancer Cells. *PLoS One* 2012, 7.
  33. Carethers, J.M. Microsatellite Instability Pathway and EMMST in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2017, 13, 73–80.
  34. Aaltonen, L.A.; Peltomäki, P.; Leach, F.S.; Sistonen, P.; Pylkkänen, L.; Mecklin, J.P.; Järvinen, H.; Powell, S.M.; Jen, J.; Hamilton, S.R. Clues to the Pathogenesis of Familial Colorectal Cancer. *Science* 1993, 260, 812–816.
  35. Ionov, Y.; Peinado, M.A.; Malkhosyan, S.; Shibata, D.; Perucho, M. Ubiquitous Somatic Mutations in Simple Repeated Sequences Reveal a New Mechanism for Colonic Carcinogenesis. *Nature* 1993, 363, 558–561.
  36. Herman, J.G.; Umar, A.; Polyak, K.; Graff, J.R.; Ahuja, N.; Issa, J.-P.J.; Markowitz, S.; Willson, J.K. V.; Hamilton, S.R.; Kinzler, K.W.; Kane M.F.; Kolodner R.D.; Vogelstein B.; Kunkel T.A.; Baylin S.B. Incidence and Functional Consequences of *HMLH1* Promoter Hypermethylation in Colorectal Carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998, 95, 6870–6875.
  37. Thibodeau, S.N.; Bren, G.; Schaid, D. Microsatellite Instability in Cancer of the Proximal Colon. *Science* 1993, 260, 816–819.
  38. Schöniger, S.; Rüschoff, J. Mismatch Repair Deficiency and Microsatellite Instability. *Encyclopedia* 2022, 2, 1559–1576.
  39. Nguyen, L.H.; Goel, A.; Chung, D.C. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* 2020, 158, 291–302.



40. Kim, J.H.; Kang, G.H. Molecular and Prognostic Heterogeneity of Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *World J Gastroenterol* 2014, *20*, 4230–4243.
41. Zhou, Z.; Li, K.; Wei, Q.; Chen, L.; Shuai, Y.; Wang, Y.; He, K.; Si, L.; Zhong, Y.; Lu, J. Tumor Mutation Burden Determined by a 645-Cancer Gene Panel and Compared with Microsatellite Instability and Mismatch Repair Genes in Colorectal Cancer. *J Gastrointest Oncol* 2021, *13*, 2775–2787.
42. Xiao, J.; Li, W.; Huang, Y.; Huang, M.; Li, S.; Zhai, X.; Zhao, J.; Gao, C.; Xie, W.; Qin, H.; Cai S.; Bai Y.; Lan P.; Zou Y. A Next-Generation Sequencing-Based Strategy Combining Microsatellite Instability and Tumor Mutation Burden for Comprehensive Molecular Diagnosis of Advanced Colorectal Cancer. *BMC Cancer* 2021, *21*.
43. Li, K.; Luo, H.; Huang, L.; Luo, H.; Zhu, X. Microsatellite Instability: A Review of What the Oncologist Should Know. *Cancer Cell Int* 2020, *20*.
44. Yang, G.; Zheng, R.Y.; Jin, Z.S. Correlations between Microsatellite Instability and the Biological Behaviour of Tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019, *145*, 2891–2899.
45. Pirini, F.; Pasini, L.; Tedaldi, G.; Scarpi, E.; Marisi, G.; Molinari, C.; Calistri, D.; Passardi, A.; Ulivi, P. Instability of Non-Standard Microsatellites in Relation to Prognosis in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci* 2020, *21*.
46. Toon, C.W.; Walsh, M.D.; Chou, A.; Capper, D.; Clarkson, A.; Sioson, L.; Clarke, S.; Mead, S.; Walters, R.J.; Clendenning, M.; Rosty C.; Young J.P.; Win A.K.; Hopper J.L.; Crook A.; von Deimling A.; Jenkins M.A.; Buchanan D.D.; Gill A.J. BRAFV600E Immunohistochemistry Facilitates Universal Screening of Colorectal Cancers for Lynch Syndrome. *American Journal of Surgical Pathology* 2013, *37*, 1592–1602.
47. Le, D.T.; Uram, J.N.; Wang, H.; Bartlett, B.R.; Kemberling, H.; Eyring, A.D.; Skora, A.D.; Luber, B.S.; Azad, N.S.; Laheru, D.; Biedrzycki B.; Donehower R.C.; Zaheer A.; Fisher G.A.; Crocenzi T.S.; Lee J.J.; Duffy S.M.; Goldberg R.M.; de la Chapelle A.; Koshiji M.; Bhajjee F.; Huebner T.; Hruban R.H.; Wood L.D.; Cuka N.; Pardoll D.M.; Papadopoulos N.; Kinzler K.W.; Zhou S.; Cornish T.C.; Taube J.M.; Anders R.A.; Eshleman J.R.;

- Vogelstein B.; Diaz L.A. Jr. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine* 2015, 372, 2509–2520.
48. Sahin, I.H.; Akce, M.; Alese, O.; Shaib, W.; Lesinski, G.B.; El-Rayes, B.; Wu, C. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of MSI-H/MMR-D Colorectal Cancer and a Perspective on Resistance Mechanisms. *Br J Cancer* 2019, 121, 809–818.
  49. Yamada, K.; Kanazawa, S.; Koike, J.; Sugiyama, H.; Xu, C.; Funahashi, K.; Boland, C.; Koi, M.; Hemmi, H. Microsatellite Instability at Tetranucleotide Repeats in Sporadic Colorectal Cancer in Japan. *Oncol Rep* 2010, 23, 551–556.
  50. Carethers, J.M.; Koi, M.; Tseng-Rogenski, S.S. EMAS T Is a Form of Microsatellite Instability That Is Initiated by Inflammation and Modulates Colorectal Cancer Progression. *Genes (Basel)* 2015, 6, 185–205.
  51. Perne, C.; Peters, S.; Cartolano, M.; Horpaopan, S.; Grimm, C.; Altmüller, J.; Sommer, A.K.; Hillmer, A.M.; Thiele, H.; Odenthal, M.; Möslin G.; Adam R.; Sivalingam S.; Kirfel J.; Schweiger M.R.; Peifer M.; Spier I.; Aretz S. Variant Profiling of Colorectal Adenomas from Three Patients of Two Families with MSH3related Adenomatous Polyposis. *PLoS One* 2021, 16.
  52. Mas-Ponte, D.; McCullough, M.; Supek, F. Spectrum of DNA Mismatch Repair Failures Viewed through the Lens of Cancer Genomics and Implications for Therapy. *Clin Sci* 2022, 136, 383–404.
  53. Chang, D.K.; Ricciardiello, L.; Goel, A.; Chang, C.L.; Boland, C.R. Steady-State Regulation of the Human DNA Mismatch Repair System. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 18424–18431.
  54. Watson, M.M.C.; Berg, M.; Søreide, K. Prevalence and Implications of Elevated Microsatellite Alterations at Selected Tetranucleotides in Cancer. *Br J Cancer* 2014, 111, 823–827.
  55. Vuković Đerfi, K.; Salar, A.; Cacev, T.; Kapitanović, S. EMAS T Type of Microsatellite Instability-A Distinct Entity or Blurred Overlap between Stable and MSI Tumors. *Genes* 2023, 14.

56. Ranjbar, R.; Esfahani, A.T.; Nazemalhosseini-Mojarad, E.; Olfatifar, M.; Aghdaei, H.A.; Mohammadpour, S. EMAS Frequency in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis and Literature Review. *Biomark Med* 2020, *14*, 1021–1030.
57. Garcia, M.; Choi, C.; Kim, H.R.; Daoud, Y.; Toiyama, Y.; Takahashi, M.; Goel, A.; Boland, C.R.; Koi, M. Association between Recurrent Metastasis from Stage II and III Primary Colorectal Tumors and Moderate Microsatellite Instability. *Gastroenterology* 2012, *143*.
58. Eso, Y.; Shimizu, T.; Takeda, H.; Takai, A.; Marusawa, H. Microsatellite Instability and Immune Checkpoint Inhibitors: Toward Precision Medicine against Gastrointestinal and Hepatobiliary Cancers. *J Gastroenterol* 2020, *55*, 15–26.
59. Tseng-Rogenski, S.S.; Hamaya, Y.; Choi, D.Y.; Carethers, J.M. Interleukin 6 Alters Localization of HSMH3, Leading to DNA Mismatch Repair Defects in Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* 2015, *148*, 579–589.
60. Caja, F.; Vodickova, L.; Kral, J.; Vymetalkova, V.; Naccarati, A.; Vodicka, P. DNA Mismatch Repair Gene Variants in Sporadic Solid Cancers. *Int J Mol Sci* 2020, *21*, 1–29.
61. Tseng-Rogenski, S.S.; Munakata, K.; Choi, D.Y.; Martin, P.K.; Mehta, S.; Koi, M.; Zheng, W.; Zhang, Y.; Carethers, J.M. The Human DNA Mismatch Repair Protein MSH3 Contains Nuclear Localization and Export Signals That Enable Nuclear-Cytosolic Shuttling in Response to Inflammation. *Mol Cell Biol* 2020, *40*.
62. Laabs, B.H.; Klein, C.; Pozojevic, J.; Domingo, A.; Brüggemann, N.; Grütz, K.; Rosales, R.L.; Jamora, R.D.; Saranza, G.; Diesta, C.C.E.; Wittig M.; Schaake S.; Dulovic-Mahlow M.; Quismundo J.; Otto P.; Acuna P.; Go C.; Sharma N.; Mulhaupt-Buell T.; Müller U.; Hanssen H.; Kilpert F.; Franke A.; Rolfs A.; Bauer P.; Dobričić V.; Lohmann K.; Ozelius L.J.; Kaiser F.J.; König I.R.; Westenberger A. Identifying Genetic Modifiers of Age-Associated Penetrance in X-Linked Dystonia-Parkinsonism. *Nat Commun* 2021, *12*.
63. Flower, M.; Lomeikaite, V.; Ciosi, M.; Cumming, S.; Morales, F.; Lo, K.; Hensman Moss, D.; Jones, L.; Holmans, P.; TRACK-HD Investigators; OPTIMISTIC Consortium;

- Monckton, D.G.; Tabrizi S.J. MSH3 Modifies Somatic Instability and Disease Severity in Huntington's and Myotonic Dystrophy Type 1. *Brain* 2019, *142*, 1876–1886.
64. Plaschke, J.; Krüger, S.; Jeske, B.; Theissig, F.; Kreuz, F.R.; Pistorius, S.; Saeger, H.D.; Iaccarino, I.; Marra, G.; Schackert, H.K. Loss of MSH3 Protein Expression Is Frequent in MLH1-Deficient Colorectal Cancer and Is Associated with Disease Progression. *Cancer Res* 2004, *64*, 864-870.
65. Tomé, S.; Manley, K.; Simard, J.P.; Clark, G.W.; Slean, M.M.; Swami, M.; Shelbourne, P.F.; Tillier, E.R.M.; Monckton, D.G.; Messer, A.; Pearson C.E. MSH3 Polymorphisms and Protein Levels Affect CAG Repeat Instability in Huntington's Disease Mice. *PLoS Genet* 2013, *9*.
66. Berndt, S.I.; Platz, E.A.; Fallin, M.D.; Thuita, L.W.; Hoffman, S.C.; Helzlsouer, K.J. Mismatch Repair Polymorphisms and the Risk of Colorectal Cancer. *Int J Cancer* 2007, *120*, 1548–1554.
67. Orimo, H.; Nakajima, E.; Yamamoto, M.; Ikejima, M.; Shimada, T; Emi, M. Association between Single Nucleotide Polymorphisms in the HMSH3 Gene and Sporadic Colon Cancer with Microsatellite Instability. *J Hum Genet.* 2000, *45*, 228–230.
68. Miao HK; Chen LP; Cai DP; Kong WJ; Xiao L; Lin J. MSH3 rs26279 Polymorphism Increases Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015, *8*, 11060–11067.
69. Morales, F.; Vásquez, M.; Santamaría, C.; Cuenca, P.; Corrales, E.; Monckton, D.G. A Polymorphism in the MSH3 Mismatch Repair Gene Is Associated with the Levels of Somatic Instability of the Expanded CTG Repeat in the Blood DNA of Myotonic Dystrophy Type 1 Patients. *DNA Repair (Amst)* 2016, *40*, 57–66.
70. Gupta, S.; Gellert, M.; Yang, W. Mechanism of Mismatch Recognition Revealed by Human MutS $\beta$  Bound to Unpaired DNA Loops. *Nat Struct Mol Biol* 2012, *19*, 72–79.
71. Junop, M.S.; Obmolova, G.; Rausch, K.; Hsieh, P.; Yang, W. Composite Active Site of an ABC ATPase: MutS Uses ATP to Verify Mismatch Recognition and Authorize DNA Repair. *Mol Cell* 2001, *7*, 1–12.

72. Wilson, T.; Guerrette, S.; Fishel, R. Dissociation of Mismatch Recognition and ATPase Activity by HSMH2-HSMH3. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274, 21659–21664.
73. Van Oers, J.M.M.; Edwards, Y.; Chahwan, R.; Zhang, W.; Smith, C.; Pechuan, X.; Schaetzlein, S.; Jin, B.; Wang, Y.; Bergman, A.; Scharff M.D.; Edelman W. The MutS $\beta$  Complex Is a Modulator of P53-Driven Tumorigenesis through Its Functions in Both DNA Double-Strand Break Repair and Mismatch Repair. *Oncogene* 2014, 33, 3939–3946.
74. Dietlein, F.; Thelen, L.; Jokic, M.; Jachimowicz, R.D.; Ivan, L.; Knittel, G.; Leeser, U.; van Oers, J.; Edelman, W.; Heukamp, L.C.; Reinhardt H.C. A Functional Cancer Genomics Screen Identifies a Druggable Synthetic Lethal Interaction between MSH3 and PRKDC. *Cancer Discov* 2014, 4, 592–605.
75. Takahashi, M.; Koi, M.; Balaguer, F.; Boland, C.R.; Goel, A. MSH3 Mediates Sensitization of Colorectal Cancer Cells to Cisplatin, Oxaliplatin, and a Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 2011, 286, 12157–12165.
76. Park, J.M.; Huang, S.; Tougeron, D.; Sinicrope, F.A. MSH3 Mismatch Repair Protein Regulates Sensitivity to Cytotoxic Drugs and a Histone Deacetylase Inhibitor in Human Colon Carcinoma Cells. *PLoS One* 2013, 8.
77. Lee, J.H.; Paull, T.T. ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science (1979)* 2005, 308, 551–554.
78. Bonner, W.M.; Redon, C.E.; Dickey, J.S.; Nakamura, A.J.; Sedelnikova, O.A.; Solier, S.; Pommier, Y.  $\gamma$ H2AX and Cancer. *Nat Rev Cancer* 2008, 8, 957–967.
79. Altaf, M.; Auger, A.; Covic, M.; Côté, J. Connection between Histone H2A Variants and Chromatin Remodeling Complexes. *Biochemistry and Cell Biology* 2009, 87, 35–50.
80. Burdova, K.; Mihaljevic, B.; Sturzenegger, A.; Chappidi, N.; Janscak, P. The Mismatch-Binding Factor MutS $\beta$  Can Mediate ATR Activation in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Mol Cell* 2015, 59, 603–614.
81. Munakata, K.; Koi, M.; Kitajima, T.; Tseng-Rogenski, S.; Uemura, M.; Matsuno, H.; Kawai, K.; Sekido, Y.; Mizushima, T.; Toiyama, Y.; Yamada T.; Mano M.; Mita E.; Kusunoki M.; Mori M.; Carethers J.M. Inflammation-Associated Microsatellite

- Alterations Caused by MSH3 Dysfunction Are Prevalent in Ulcerative Colitis and Increase With Neoplastic Advancement. *Clin Transl Gastroenterol* 2019, 10.
82. Anderson, N.M.; Simon, M.C. The Tumor Microenvironment. *Current Biology* 2020, 30, 921–925.
  83. Duan, Q.; Zhang, H.; Zheng, J.; Zhang, L. Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer* 2020, 6, 605–618.
  84. Taher, M.Y.; Davies, D.M.; Maher, J. The Role of the Interleukin (IL)-6/IL-6 Receptor Axis in Cancer. *Biochem Soc Trans* 2018, 46, 1449–1462.
  85. Kishimoto, T.; Akira, S.; Narazaki, M.; Taga, T. Interleukin-6 Family of Cytokines and Gp130. *Blood* 1995, 86, 1243–1254.
  86. Johnson, D.E.; O’Keefe, R.A.; Grandis, J.R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 Signalling Axis in Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2018, 15, 234–248.
  87. Waldner, M.J.; Foersch, S.; Neurath, M.F. Interleukin-6 - A Key Regulator of Colorectal Cancer Development. *Int J Biol Sci* 2012, 8, 1248–1253.
  88. Becker, C.; Fantini, M.C.; Wirtz, S.; Nikolaev, A.; Lehr, H.A.; Galle, P.R.; Rose-John, S.; Neurath, M.F. IL-6 Signaling Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer. *Cell Cycle* 2005, 4, 220–223.
  89. Turano, M.; Cammarota, F.; Duraturo, F.; Izzo, P.; De Rosa, M. A Potential Role of Il-6/Il-6r in the Development and Management of Colon Cancer. *Membranes* 2021, 11.
  90. Holmer, R.; Wätzig, G.H.; Tiwari, S.; Rose-John, S.; Kalthoff, H. Interleukin-6 Trans-Signaling Increases the Expression of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules 5 and 6 in Colorectal Cancer Cells. *BMC Cancer* 2015, 15, 1.
  91. Chalaris, A.; Garbers, C.; Rabe, B.; Rose-John, S.; Scheller, J. The Soluble Interleukin 6 Receptor: Generation and Role in Inflammation and Cancer. *Eur J Cell Biol* 2011, 90, 484–494.

92. Taga, T.; Hibi, M.; Hirata, Y.; Yamasaki, K.; Yasukawa, K.; Matsuda, T.; Hirano, T.; Kishimoto, T. Interleukin-6 Triggers the Association of Its Receptor with a Possible Signal Transducer, Gp130. *Cell* 1989, 58, 573–581.
93. Okugawa, Y.; Miki, C.; Toiyama, Y.; Yasuda, H.; Yokoe, T.; Saigusa, S.; Hiro, J.; Tanaka, K.; Inoue, Y.; Kusunoki, M. Loss of Tumoral Expression of Soluble IL-6 Receptor Is Associated with Disease Progression in Colorectal Cancer. *Br J Cancer* 2010, 103, 787–795.
94. Mühlberg, J.; Schooltink, H.; Stoyan, T.; Lutz Graeve, M.G.; Buse, G.; Mackiewicz, A.; Heinrich, P.C.; Rose-John, S. The Soluble Interleukin-6 Receptor Is Generated by Shedding. *Eur. J. Immunol* 1993, 23, 473–480.
95. Müller-Newen, G.; Köhne, C.; Keul, R.; Hemmann, U.; Müller-Esterl, W.; Wijdenes, J.; Brakenhoff, J.P.J.; Hart, M.H.L.; Heinrich, P.C. Purification and Characterization of the Soluble Interleukin-6 Receptor from Human Plasma and Identification of an Isoform Generated through Alternative Splicing. *Eur J Biochem* 1996, 236, 837–842.
96. Wolf, J.; Rose-John, S.; Garbers, C. Interleukin-6 and Its Receptors: A Highly Regulated and Dynamic System. *Cytokine* 2014, 70, 11–20.
97. Rose-John, S. Il-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Proinflammatory Activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 2012, 8, 1237–1247.
98. Scheller, J.; Chalaris, A.; Schmidt-Arras, D.; Rose-John, S. The Pro- and Anti-Inflammatory Properties of the Cytokine Interleukin-6. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2011, 1813, 878–888.
99. Waldner, M.J.; Neurath, M.F. Master Regulator of Intestinal Disease: IL-6 in Chronic Inflammation and Cancer Development. *Semin Immunol* 2014, 26, 75–79.
100. Jostock, T.; Müllberg, J.; Özbek, S.; Atreya, R.; Blinn, G.; Voltz, N.; Fischer, M.; Neurath, M.F.; Rose-John, S. Soluble Gp130 Is the Natural Inhibitor of Soluble Interleukin-6 Receptor Transsignaling Responses. *Eur J Biochem* 2001, 268, 160–167.
101. Bollrath, J.; Pheese, T.J.; von Burstin, V.A.; Putoczki, T.; Bennecke, M.; Bateman, T.; Nebelsiek, T.; Lundgren-May, T.; Canli, Ö.; Schwitalla, S.; Matthews V.; Schmid R.M.;

- Kirchner T.; Arkan M.C.; Ernst M.; Greten F.R. Gp130-Mediated Stat3 Activation in Enterocytes Regulates Cell Survival and Cell-Cycle Progression during Colitis-Associated Tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009, *15*, 91–102.
102. Fishman, D.; Faulds, G.; Jeffery, R.; Mohamed-Ali, V.; Yudkin, J.S.; Humphries, S.; Woo, P. The Effect of Novel Polymorphisms in the Interleukin-6 (IL-6) Gene on IL-6 Transcription and Plasma IL-6 Levels, and an Association with Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis. *J. Clin. Invest* 1998, *102*, 1369–1376.
103. Jones, K.G.; Brull, ; D J; Brown, ; L C; Sian, ; M; Greenhalgh, ; R M; Humphries, ; S E; Powell, ; J T Interleukin-6 (IL-6) and the Prognosis of Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* 2001, *103*, 2260–2265.
104. Jafari-Nedooshan, J.; Dastgheib, S.A.; Kargar, S.; Zare, M.; Raei-Ezzabadi, A.; Heiranizadeh, N.; Sadeghizadeh-Yazdi, J.; Neamatzadeh, H. Association of IL-6 –174 G>C Polymorphism with Susceptibility to Colorectal Cancer and Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Acta Med* 2019, *62*, 137–146.
105. Theodoropoulos, G.; Papaconstantinou, I.; Felekouras, E.; Nikiteas, N.; Karakitsos, P.; Panoussopoulos, D.; Lazaris, A.C.; Patsouris, E.; Bramis, J.; Gazouli, M. Relation between Common Polymorphisms in Genes Related to Inflammatory Response and Colorectal Cancer. *World J Gastroenterol* 2006, *12*, 5037–5043.
106. Landi, S.; Moreno, V.; Gioia-Patricola, L.; Guino, E.; Navarro, M.; de Oca, J.; Capella, G.; Canzian, F.; Bellvitge Colorectal Cancer Study Group Association of Common Polymorphisms in Inflammatory Genes Interleukin (IL)6, IL8, Tumor Necrosis Factor Alpha, NFKB1, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma with Colorectal Cancer. *Cancer Res* 2003, *63*, 3560–3566.
107. Garbers, C.; Monhasery, N.; Aparicio-Siegmund, S.; Lokau, J.; Baran, P.; Nowell, M.A.; Jones, S.A.; Rose-John, S.; Scheller, J. The Interleukin-6 Receptor Asp358Ala Single Nucleotide Polymorphism Rs2228145 Confers Increased Proteolytic Conversion Rates by ADAM Proteases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2014, *1842*, 1485–1494.



108. Galicia, J.C.; Tai, H.; Komatsu, Y.; Shimada, Y.; Akazawa, K.; Yoshie, H. Polymorphisms in the IL-6 Receptor (IL-6R) Gene: Strong Evidence That Serum Levels of Soluble IL-6R Are Genetically Influenced. *Genes Immun* 2004, 5, 513–516.
109. Rafiq, S.; Frayling, T.M.; Murray, A.; Hurst, A.; Stevens, K.; Weedon, M.N.; Henley, W.; Ferrucci, L.; Bandinelli, S.; Corsi, A.M.; Guralnik J.M.; Melzer D. A Common Variant of the Interleukin 6 Receptor (IL-6r) Gene Increases IL-6r and IL-6 Levels, without Other Inflammatory Effects. *Genes Immun* 2007, 8, 552–559.
110. Wonnerth, A.; Katsaros, K.M.; Krychtiuk, K.A.; Speidl, W.S.; Kaun, C.; Thaler, K.; Huber, K.; Wojta, J.; Maurer, G.; Seljeflot, I.; Arnesen H.; Weiss T.W. Glycoprotein 130 Polymorphism Predicts Soluble Glycoprotein 130 Levels. *Metabolism* 2014, 63, 647–653.
111. Spaventi, R.; Pecur, L.; Pavelic, K.; Pavelic, Z.P.; Spaventi, S.; Stambrook, P.J. Human Tumour Bank in Croatia: A Possible Model for a Small Bank as Part of the Future European Tumour Bank Network. *Eur J Cancer* 1994, 30, 419.
112. Mitchell, L.G.; Bodenteich, A.; Merrill, C.R. Use of Silver Staining to Detect Nucleic Acids. *Methods Mol Biol.* 1996, 58, 97–103.
113. Khooshemehri, P.; Jamaldini, S.H.; Amir, S.; Ziaee, M.; Afshari, M.; Sattari, M.; Narouie, B.; Sotoudeh, M.; Montazeri, V.; Sarhangi, N.; Hasanzad M. Genetic Polymorphism of Mismatch Repair Genes and Susceptibility to Prostate Cancer. *Urol J.* 2020, 17, 271–275.
114. Topchieva, L. V.; Korneva, V.A.; Kurbatova, I. V. The Relationship of the Carriership of Allelic Variations in Rs2228145 (A > C) of the IL6R Gene with the Levels of VCAM1 and ICAM1 Gene Transcripts in Patients with Essential Hypertension. *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii* 2020, 24, 96–101.
115. Grady, W.M.; Carethers, J.M. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 2008, 135, 1079–1099.
116. Basak, D.; Uddin, M.N.; Hancock, J. The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC). *Cancers* 2020, 12, 1–31.

117. Koessler, T.; Oestergaard, M.Z.; Song, H.; Tyrer, J.; Perkins, B.; Dunning, A.M.; Easton, D.F.; Pharoah, P.D.P. Common Variants in Mismatch Repair Genes and Risk of Colorectal Cancer. *Gut* 2008, *57*, 1097–1101.
118. Rizzo, A.; Pallone, F.; Monteleone, G.; Fantini, M.C. Intestinal Inflammation and Colorectal Cancer: A Double-edged Sword? *World J Gastroenterol* 2011, *17*, 3092–3100.
119. Francescone, R.; Hou, V.; Grivennikov, S.I. Cytokines, IBD, and Colitis-Associated Cancer. *Inflamm Bowel Dis* 2015, *21*, 409–418.
120. Taniguchi, K.; Karin, M. IL-6 and Related Cytokines as the Critical Lynchpins between Inflammation and Cancer. *Semin Immunol* 2014, *26*, 54–74.
121. Schneider, M.R.; Hoeflich, A.; Fischer, J.; Wolf, E.; Sordat, B.; Lahm, H. Interleukin-6 Stimulates Clonogenic Growth of Primary and Metastatic Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Lett.* 2000, *151*, 31–38.
122. Chang, Q.; Bournazou, E.; Sansone, P.; Berishaj, M.; Gao, S.P.; Daly, L.; Wels, J.; Theilen, T.; Granitto, S.; Zhang, X.; Cotari, J.; Alpaugh, M.L.; de Stanchina, E.; Manova, K.; Li, M.; Bonafe, M.; Ceccarelli, C.; Taffurelli, M.; Santini, D.; Altan-Bonnet, G.; Kaplan, R.; Norton, L.; Nishimoto, N.; Huszar, D.; Lyden, D.; Bromberg, J. The IL-6/JAK/Stat3 Feed-Forward Loop Drives Tumorigenesis and Metastasis. *Neoplasia* 2013, *15*, 848–862.
123. Terry, C.F.; Loukaci, V.; Green, F.R. Cooperative Influence of Genetic Polymorphisms on Interleukin 6 Transcriptional Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 2000, *275*.
124. Narazaki, M.; Yasukawa, K.; Saito, T.; Ohsugi, Y.; Fukui, H.; Koishihara, Y.; Yancopoulos, G.D.; Taga, T.; Kishimoto, T. Soluble Forms of the Interleukin-6 Signal-Transducing Receptor Component Gp130 in Human Serum Possessing a Potential to Inhibit Signals Through Membrane-Anchored Gp130. *Blood* 1993, *82*, 1120–1126.
125. Atreya, R.; Mudter, J.; Finotto, S.; Müllberg, J.; Jostock, T.; Wirtz, S.; Schütz, M.; Bartsch, B.; Holtmann, M.; Becker, C.; Strand, D.; Czaja, J.; Schlaak, J.F.; Lehr, H.A.; Autschbach, F.; Schürmann, G.; Nishimoto, N.; Yoshizaki, K.; Ito, H.; Kishimoto, T.; Galle, P.R.; Rose-John, S.; Neurath, M.F. Blockade of Interleukin 6 Trans Signaling Suppresses T-Cell Resistance

- against Apoptosis in Chronic Intestinal Inflammation: Evidence in Crohn Disease and Experimental Colitis in Vivo. *Nat Med* 2000, 6, 583–588.
126. Mitsuyama, K.; Matsumoto, S.; Rose-John, S.; Suzuki, A.; Hara, T.; Tomiyasu, N.; Handa, K.; Tsuruta, O.; Funabashi, H.; Scheller, J.; Toyonaga A.; Sata M. STAT3 Activation via Interleukin 6 Trans-Signalling Contributes to Ileitis in SAMP1/Yit Mice. *Gut* 2006, 55, 1263–1269.
  127. Chowdhury, D.; Keogh, M.C.; Ishii, H.; Peterson, C.L.; Buratowski, S.; Lieberman, J.  $\gamma$ -H2AX Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2A Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *Mol Cell* 2005, 20, 801–809.
  128. Liebl, M.C.; Hofmann, T.G. The Role of P53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers* 2021, 13.
  129. Shin, G.W.; Greer, S.U.; Hopmans, E.; Grimes, S.M.; Lee, H.J.; Zhao, L.; Miotke, L.; Suarez, C.; Almeda, A.F.; Haraldsdottir, S.; Ji H.P. Profiling Diverse Sequence Tandem Repeats in Colorectal Cancer Reveals Co-Occurrence of Microsatellite and Chromosomal Instability Involving Chromosome 8. *Genome Med* 2021, 13.
  130. Matsuno, Y.; Atsumi, Y.; Shimizu, A.; Katayama, K.; Fujimori, H.; Hyodo, M.; Minakawa, Y.; Nakatsu, Y.; Kaneko, S.; Hamamoto, R.; Shimamura T.; Miyano S.; Tsuzuki T.; Hanaoka F.; Yoshioka K.I. Replication Stress Triggers Microsatellite Destabilization and Hypermutation Leading to Clonal Expansion in Vitro. *Nat Commun* 2019, 10.

## 8. SAŽETAK

Karcinom debelog crijeva jedan je od najčešćih zloćudnih tumora te jedan od vodećih uzroka smrti u razvijenom svijetu. Mikrosatelitna nestabilnost javlja se uslijed gubitka funkcije sustava MMR te doprinosi brzom akumulaciji velikog broja mutacija u kratkom vremenu. Razlikujemo dva tipa mikrosatelitne nestabilnosti: MSI i E-MSI. Nastanak nestabilnosti tipa E-MSI povezana je s reverzibilnim premještanjem hMSH3 iz jezgre u citoplazmu gdje ne može sudjelovati u popravku DNA. Pretpostavlja se da je potencijalni uzrok ovog premještanja signalizacija putem IL-6. Stoga smo u ovom radu ispitali ekspresiju proteina hMSH3, IL-6 i  $\gamma$ H2A.X, kao i status polimorfizama gena *MSH3*, *IL-6*, *IL-6R* i *gp130* u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva, obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. U našem istraživanju skupine su definirane tako da razlikujemo nestabilnost tipa E-MSI koja se javlja samostalno ili udružena s nestabilnosti na dinukleotidnim mikrosatelitnim ponavljanjima (skupina E) odnosno E-MSI koji se javlja udruženo s nestabilnosti na mononukleotidnim mikrosatelitnim ponavljanjima (skupina M) u odnosu na tumore u kojima nije utvrđena mikrosatelitna nestabilnost (skupina S). U našem istraživanju je u skupinama E i M utvrđen veći udio jezgara negativnih na hMSH3 u odnosu na skupinu S. Analizom raspodjele genotipova funkcionalnih polimorfizama gena *MSH3* (polimorfizma repetitivne sekvence u eksonu 1 gena *MSH3* i *MSH3* +3133A/G) nije dokazana razlika između pojedinih skupina obzirom na prisutnost i tip mikrosatelitne nestabilnosti. Rezultati dobiveni analizom polimorfizma *IL-6* -174G/C ukazuju na to da je genotip CC učestaliji u skupini E u odnosu na skupinu S. Nije utvrđena značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova polimorfizama *IL-6R* +48892A/C između pojedinih skupina. Nosioci alela C polimorfizma *gp130* +148G/C bili su značajno manje zastupljeni u skupini E u odnosu na skupinu S. U tumorima u kojima nisu dokazane mutacije gena *TP53* utvrđen je veći udio jezgara pozitivnih na  $\gamma$ H2A.X u skupini E u odnosu na skupine S i M. Očekuje se da će rezultati ovog istraživanja doprinijeti razjašnjavanju utjecaja hMSH3 i IL-6 na pojavnost mikrosatelitne nestabilnosti i dvolančanih lomova DNA u sporadičnim karcinomima debelog crijeva.

## 9. SUMMARY

Colorectal cancer is one of the most common malignancies and one of the leading causes of death in the developed world. Microsatellite instability occurs due to the loss of function of the MMR system and contributes to the rapid accumulation of a large number of mutations in a short period of time. There are two types of microsatellite instability: MSI and EMMET. The occurrence of EMMET type of instability is associated with the reversible shift of hMSH3 from the nucleus to the cytoplasm, where it cannot participate in DNA repair. It is assumed that a potential cause of this translocation is signaling through IL-6. Therefore, in this study, we have examined the expression of hMSH3, IL-6, and  $\gamma$ H2A.X proteins, as well as the status of polymorphisms within the *MSH3*, *IL-6*, *IL-6R*, and *gp130* genes in patients with sporadic colorectal cancer, with respect to the presence and type of microsatellite instability. In our research, groups were defined to differentiate EMMET instability occurring independently or in association with instability at dinucleotide microsatellite repeats (group E), and EMMET instability occurring combined with instability at mononucleotide microsatellite repeats (group M) compared to tumors where microsatellite instability was not detected (group S). Compared to the group S, groups E and M exhibited a higher percentage of hMSH3 negative nuclei. An analysis of the distribution of genotypes of functional polymorphisms of the *MSH3* gene (polymorphism of the repetitive sequence in exon 1 of the *MSH3* gene and *MSH3* +3133A/G) did not show a difference between individual groups in terms of the presence and type of microsatellite instability. Results obtained by analyzing the *IL-6* -174G/C polymorphism indicate that the CC genotype is more common in group E compared to group S. No significant difference was found in the frequency of individual genotypes of the *IL-6R* +48892A/C polymorphism between the groups in terms of the presence and type of microsatellite instability. Carriers of the *gp130* +148C allele were less frequent in the group E compared to the group S. In the subset of tumors lacking *TP53* mutations, a higher percentage of the  $\gamma$ H2A.X positive nuclei was observed in group E compared to the groups S and M. It is expected that the results of this study will contribute to the elucidation of the hMSH3 and IL-6 role in the occurrence of microsatellite instability and double-strand DNA breaks in sporadic colorectal cancers.

## 10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

Anamarija Salar, rođena 6. srpnja 1993. u Zagrebu, započela je svoj akademski put na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je 2019. godine stekla zvanje magistre molekularne biologije. U diplomskog radu kojeg je izradila pod vodstvom prof. dr. sc. Sanje Kapitanović i izv. prof. dr. sc. Inge Marijanović bavila se istraživanjem polimorfizama gena *TLR4* u tumorigenezi sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Nakon diplome, 2019. godine upisala je Doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Usporedno s doktorskim studijem, zaposlena je preko programa „Razvoj karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“, na radno mjesto asistenta u Laboratoriju za personaliziranu medicinu na Institutu Ruđer Bošković. Ovaj doktorski rad pod mentorstvom dr.sc. Tamare Čačev izrađen je u istom laboratoriju. Od 2019. do 2022. bila je suradnica na projektu HRZZ „Mikrosatelitna nestabilnost (MSI i EMAS) u molekularnom profiliranju sporadičnih karcinoma debelog crijeva“, te sudionica u COST Akciji BM1206 „Cooperation Studies on Inherited Susceptibility to Colorectal Cancer“. Također je članica *European Association for Cancer Research (EACR)* i Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR). Aktivno sudjelujem u popularizaciji znanosti, te je 2019. sudjelovala u organizaciji popularno-znanstvenih predavanja u sklopu Festivala znanosti, te Otvorenih dana Instituta Ruđer Bošković. Sudjelovala je na nekoliko međunarodnih radionica te skupova gdje je prezentirala rezultate svojeg istraživanja kroz poster prezentacije.

### Popis publikacija

Vuković Đerfi, K.; Salar, A.; Cacev, T.; Kapitanović, S. EMAS Type of Microsatellite Instability—A Distinct Entity or Blurred Overlap between Stable and MSI Tumors. *Genes* 2023, 14, 1474.

### Poster prezentacije na međunarodnim skupovima:

1. Salar A., Čačev T., Kapitanović S. *IL-6R polymorphism rs2228145 and gp130 polymorphism rs3729960 do not contribute to microsatellite instability in sporadic colorectal cancer*, HDIR-6 “Targeting cancer” (Zagreb, 10-12.11.2022.)
2. Salar A., Pačić A., Čačev T., Kapitanović S. *Intratumor heterogeneity of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer*, Fifth Congress of the Serbian Association for Cancer Research (SDIR): “Translational potential of cancer research in Serbia” (virtual event 03.12.2021.) (kongresni sažetak u zborniku radova)